

Université de Sherbrooke

**Développement d'une méthode par spectrométrie de masse en tandem pour
l'évaluation de la podocyturie chez des patients atteints de la maladie de Fabry et de
prééclampsie**

Par
Tristan Martineau
Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Juin 2019

Membres du jury d'évaluation
Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D., Département de pédiatrie, Université de Sherbrooke
Darel Hunting, Ph.D., Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de
Sherbrooke
Dr Joe TR Clarke, Département de pédiatrie, Université de Toronto

© Tristan Martineau 2019

*À mon épouse, Stéphanie,
À Christiane,
Et tous ceux qui m'ont encouragé et soutenu.*

Quand nous sommes bien résolus d'accomplir un acte important, ce n'est pas la promptitude qui assurera le succès, mais la persévérance dans la volonté.
Citation de Louis-Auguste Martin, L'esprit moral du XIXe siècle (1855)

RÉSUMÉ

Développement d'une méthode par spectrométrie de masse en tandem pour l'évaluation de la podocyture chez des patients atteints de la maladie de Fabry et de prééclampsie

Tristan Martineau

Programmes de Sciences des radiations et d'imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les podocytes sont des cellules viscérales hautement différenciées. Plusieurs protéines spécifiques, telles que la podocalyxine et la podocine, peuvent être analysées pour l'évaluation de la podocyture. Cependant, la quantification précise des protéines liées à la podocyture est complexe et souvent peu fiable. Une méthode en chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été développée et validée pour quantifier les niveaux de podocalyxine et de podocine dans le surnageant de spécimens d'urine de patients. La quantification protéique a été basée sur la mesure de la concentration équimolaire d'un peptide de la podocalyxine et de la podocine et l'utilisation de standards internes de peptides clivables. Des échantillons provenant d'urine de femmes ayant une grossesse normotensive ou hypertensive, souffrant de diabète gestationnel et de prééclampsie, des patients atteints de la maladie de Fabry (hommes et femmes) traités et non traités, de même que des hommes et des femmes contrôles ont été évalués. Les résultats de l'analyse en multiplex montrent que les concentrations de podocalyxine étaient supérieures à celles de la podocine chez l'ensemble des patients, et particulièrement élevées chez les femmes enceintes. Les femmes atteintes de prééclampsie présentaient des taux anormaux de ces deux protéines dans l'urine, avec une sensibilité plus élevée pour la podocalyxine. Des taux légèrement supérieurs de podocine ont également été observés chez les hommes Fabry, tandis que les deux protéines présentaient des niveaux élevés chez les femmes Fabry non traitées. Des corrélations ont été établies entre les niveaux de podocalyxine et de podocine et les paramètres cliniques associés à la maladie de Fabry et à la prééclampsie. Cette méthodologie novatrice permet l'analyse simultanée et précise des niveaux de podocalyxine et de podocine, tout en nécessitant une faible quantité d'échantillon d'urine. Ce projet de recherche a permis d'offrir un outil fiable pour l'évaluation de la podocyture chez les patients.

Mots clés : Spectrométrie de masse en tandem, Podocyture, Maladie de Fabry, Prééclampsie, Podocine, Podocalyxine, Urine

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Introduction	1
1.1 Le système rénal.....	1
1.1.1 Reins	1
1.1.2 Néphron	2
1.1.3 Glomérules.....	3
1.1.3.1 Endothélium	3
1.1.3.2 Membrane basale glomérulaire	4
1.1.3.3 Podocytes	4
1.2 Outils conventionnels pour le diagnostic des problèmes rénaux utilisant l'urine..	5
1.2.1 Réduction du débit de filtration glomérulaire	6
1.2.2 Protéinurie et albuminurie	6
1.2.3 Limitations des outils existants	7
1.3 Podocyturie.....	8
1.3.1 Physiopathologie.....	8
1.3.2 Traitement de la podocyturie	9
1.3.3 Protéines urinaires spécifiques d'intérêt.....	9
1.3.3.1 Podocine	9
1.3.3.2 Podocalyxine	10
1.3.4 Stratégies pour évaluer la podocyturie.....	10
1.3.4.1 Marquage par immunofluorescence des podocytes	11
1.3.4.2 Évaluation de la podocyturie par amplification en chaîne par polymérase quantitative11	
1.3.4.3 Évaluation de la podocyturie par spectrométrie de masse	11
1.4 Prééclampsie	12
1.4.1 Introduction et incidence	12
1.4.2 Physiopathologie.....	12
1.4.3 Risques relatifs.....	13
1.4.4 Manifestations cliniques caractéristiques de la prééclampsie.....	14
1.4.4.1 Critères pour le diagnostic et la sévérité	14

1.4.4.2 Problèmes vasculaires	15
1.4.4.3 Problèmes rénaux	15
1.4.5 Traitements	16
1.4.6 Recherche de nouveaux outils de prédiction de la prééclampsie	16
1.4.6.1 Étude des artères utérines par la méthode de Doppler	17
1.4.6.2 Quantification des facteurs angiogéniques	17
1.4.6.3 Évaluation de la podocyturie pour la prééclampsie	18
1.5 Maladie de Fabry	19
1.5.1 Maladies génétiques et leur transmission	19
1.5.2 Maladies lysosomales	21
1.5.3 Définition et physiopathologie de la maladie de Fabry	22
1.5.4 Manifestations cliniques	24
1.5.4.1 Forme classique et forme tardive	24
1.5.4.2 Problèmes rénaux	24
1.5.5 Traitements	25
1.5.5.1 Thérapie enzymatique de remplacement	25
1.5.5.2 Thérapie par chaperons	25
1.5.5.3 Thérapie génique	26
1.5.5.4 Thérapie par réduction de substrat	26
1.5.6 Évaluation de la podocyturie chez les patients atteints de la maladie de Fabry	27
1.6 Présentation du projet	28
1.6.1 Problématiques et hypothèses	28
1.6.2 Objectifs	29
1.6.3 Perspectives du projet	29
1.7 Spectrométrie de masse	30
1.7.1 Historique	30
1.7.2 Principes de la spectrométrie de masse	30
1.7.2.1 Définition	30
1.7.2.2 Fonctionnement général d'un spectromètre de masse	31
1.7.2.3 Chromatographie liquide en phase inverse	32
1.7.2.4 Électronébulisation	33
1.7.2.5 Spectrométrie de masse triple quadripolaire (en tandem)	35
1.7.2.6 Spectrométrie de masse de type temps de vol	37
1.8 Développement d'une méthode analytique par spectrométrie de masse en tandem	39

1.8.1 Éléments initiaux à considérer	39
1.8.1.1 Sélection des protéines visées pour la méthode	39
1.8.1.2 Stratégie analytique des protéines et sélection des transitions MRM	40
1.8.1.3 Optimisation de la détection du signal	44
1.8.1.4 Choix de la matrice: le culot ou le surnageant pour l'analyse des protéines urinaires	45
1.8.2 Effet de matrice.....	46
1.8.2.1 Utilisation d'un standard interne approprié	47
1.8.2.2 Déplétion des protéines abondantes interférentes.....	50
1.8.3 Éléments à considérer lors de la digestion enzymatique	51
1.8.3.1 pH des échantillons	51
1.8.3.2 Linéarisation des protéines	52
1.8.3.3 Temps de digestion et concentration de l'enzyme	54
1.8.4 Éléments à considérer après la digestion	56
1.8.4.1 Purification et concentration de l'échantillon	56
1.8.4.2 Concentration des molécules d'intérêt.....	58
1.9 Validation d'une méthode analytique	58
1.9.1 Évaluation intra et inter-jour de la précision et l'exactitude des résultats.....	58
1.9.2 Évaluation de la limite de quantification et de détection.....	59
1.9.3 Évaluation de la courbe de calibration.....	60
1.9.4 Évaluation de la stabilité des molécules dans l'urine	61
1.9.5 Évaluation de l'effet de matrice.....	62
1.9.6 Évaluation de l'adhésion au plastique.....	62
1.9.7 Évaluation de la récupération des molécules d'intérêt.....	63
Article 1.....	64
Discussion	102
Conclusions.....	107
Remerciements	108
Liste des références.....	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Coupe schématique: a) Système rénal et b) Rein.	1
Figure 2. Coupe schématique d'un néphron.	2
Figure 3. Coupe schématique d'un capillaire glomérulaire et des podocytes.....	5
Figure 4. Exemples de mutations au niveau d'un gène.	20
Figure 5. Transmission d'une maladie génétique liée à l'X, si la femme est porteuse du gène muté.	20
Figure 6. Classification traditionnelle des maladies de surcharge lysosomale.	22
Figure 7. Structures chimiques et sites de clivage de l' α -Gal A: a) Globotriaosylcéramide, b) Globotriaosylsphingosine, et c) Galabiosylcéramide.	23
Figure 8. Coupe schématique d'un spectromètre de masse.	31
Figure 9. Impact sur les peptides selon le type de colonne utilisée en chromatographie. ...	33
Figure 10. Coupe schématique de l'électronébulisation positive (ESI +).	34
Figure 11. Principe de sélection des ions selon leur rapport m/z	35
Figure 12. Principe d'analyse d'un ion à l'aide du monitoring de réaction simple (SRM).36	
Figure 13. Xevo TQ-S, spectromètre de masse en tandem (à droite) couplé à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance Acquity I-Class (à gauche) (Waters Corp.).	36
Figure 14. Synapt G1, spectromètre de masse en temps de vol (à droite) couplé à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance Acquity H-Class (à gauche) (Waters Corp.).	39
Figure 15. Schéma des sites de clivage de la trypsine sur un polypeptide.	41
Figure 16. Représentation des ions fragments y et b théoriques sur un peptide.	42
Figure 17. Profil des peptides détectés de la podocine.	43
Figure 18. Analyse des ions fragments produits de l'ATFNPAQDK sur le Q-TOF.	44
Figure 19. Chromatogramme de l'analyse MRM de ATFNAPQDK et APAATVVDVDEVR Cps: comptes par seconde.....	44
Figure 20. Optimisation de l'énergie de collision pour les peptides analysés.	45
Figure 21. Détection relative de la podocalyxine endogène dans l'urine.	46

Figure 22. Évaluation de la pureté isotopique du standard interne digéré de la podocalyxine.	49
Figure 23. Évaluation de la concentration de l'albumine sérique humaine sur la digestion des standards peptidiques clivables à 2 nM.	51
Figure 24. Résumé du signal peptidique obtenu en utilisant différents agents dénaturants lors de la digestion enzymatique.	52
Figure 25. Effet du rapport de dithiothiétol/iodoacétamide lors de la digestion des peptides clivables utilisés pour évaluer la concentration protéique de la podocyture.	53
Figure 26. Évaluation de la digestion dans le temps avec et sans carbamidométhylation du CRAVKATFNPAQDKCGIRL.	54
Figure 27. Évaluation de l'efficacité de la digestion dans le temps et selon le rapport molaire trypsine/protéines HSA.	55
Figure 28. Courbe linéaire de quantification de l'albumine sérique humaine après 2 h de digestion, à 37°C, avec 50 µg de trypsine.	56
Figure 29. Évaluation du pourcentage de récupération des peptides lors de l'extraction MCX.	57
Figure 30. Courbes de calibration de la podocalyxine et de la podocine.	60
Figure 31. Stabilité de la podocalyxine dans le temps à différentes températures et à différentes concentrations.	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Catégorisation et pronostic des dommages chroniques rénaux (adultes).	6
Tableau 2. Pronostic des dommages rénaux selon l'albuminurie (adultes).....	7
Tableau 3. Principaux facteurs de risques relatifs à la prééclampsie.	13
Tableau 4. Critères permettant le diagnostic de la prééclampsie.....	14
Tableau 5. Symptômes classiques chez les patients atteints de la maladie de Fabry.	24
Tableau 6. Exemples d'enzymes utilisées pour la protéolyse des protéines	41
Tableau 7. Résumé des séquences peptiques synthétisées et leurs transitions MRM.	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -Gal A	Alpha-galactosidase A
ACN	Acétonitrile
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
CFDI	<i>Canadian Fabry Disease Initiative</i>
Da	Unité en Dalton
DEA	Débit d'excrétion d'albumine pendant 24 h
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DOC	Déoxycholate de sodium
DTT	Dithiothréitol
ESI +	Électronébulisation positive
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Ga ₂	Galabiosylcéramide
Gb ₃	Globotriaosylcéramide
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count</i>
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i>
HQC	Contrôle de qualité à haute concentration
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HSA	Albumine sérique humaine
IC	Intervalle de confiance
ISSHP	Société internationale sur l'étude de l'hypertension dans la prééclampsie
K	Lysine
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
LQC	Contrôle de qualité à faible concentration
Lyso-Gb ₃	Globotriaosylsphingosine
MCX	Phase stationnaire mixte échangeuses de cations
MRM	Monitoring de réactions multiples
MS	Spectromètre de masse
MS/MS	Spectromètre de masse en tandem
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge d'un ion
NICE	<i>National Clinical Guideline Centre</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
P	Proline
pH	Potentiel hydrogène
PIGF	Facteur de croissance placentaire
qPCR	Amplification en chaîne par polymérase quantitative
QC	Contrôle de qualité

Q-TOF	Spectromètre de masse quadripolaire couplé à un analyseur en temps de vol
R	Arginine
R ²	Régression de la courbe
RAC	Coefficient de variation
RSD	Rapport albumine/créatinine
RR	Risque relatif
SCr	Créatinine sérique
SCys	Cystatine sérique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
sFlt-1	Tyrosine kinase-1
SRM	Monitoring de réaction sélective
TER	Thérapie d'enzyme de remplacement
UPLC	Chromatographie liquide ultra performante
UPLC-MS/MS	Chromatographie liquide ultra-performante couplée à un spectromètre de masse en tandem
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
*	Acide aminé lourd composé d'isotopes stables
/	Site de clivable enzymatique de la peptide dans la séquence peptidique

INTRODUCTION

1.1 Le système rénal

1.1.1 Reins

Le système rénal, aussi connu sous le nom de système urinaire, a de multiples fonctions essentielles et vitales chez l'humain. Comme le montre la Figure 1, il est principalement formé de la vessie, de l'urètre, de l'uretère et d'une paire d'organes rétropéritonéaux légèrement décalés et séparés par la colonne vertébrale, soit les reins (Maden et Tisher, 2004).

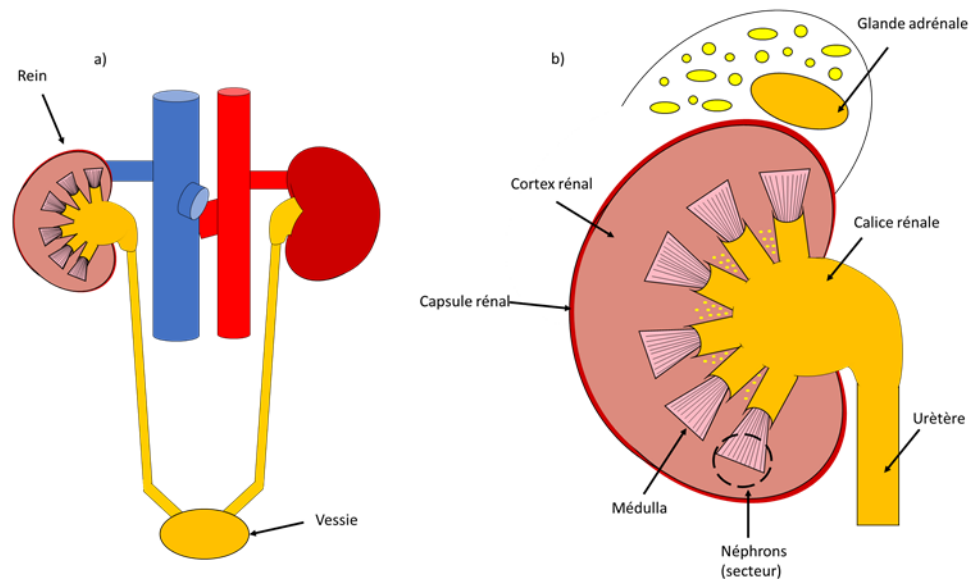


Figure 1. Coupe schématique: a) Système rénal et b) Rein.

Reliés à l'aorte et à la veine cave inférieure par diverses artérioles et veinules, les reins assurent la régulation de la pression sanguine, du contenu plasmatique et sanguin tout en permettant la formation de l'urine. De plus, ils assurent l'excrétion des déchets métaboliques et des substances exogènes ou toxiques comme les déchets azotés, la créatinine et les molécules endogènes en excès. D'autre part, les reins permettent d'éliminer l'excédent en eau et en électrolytes dans le corps, régulent le volume de fluides extracellulaires et assurent l'osmolalité au niveau du plasma sanguin. Aussi, ils sont responsables de produire des substances vasoactives qui régulent la tension artérielle. Finalement, le système rénal

contrôle la production de globules rouges via la production d'érythropoïétine, maintient l'équilibre acido-basique sanguin, régularise la production de vitamine D et active et assure un apport de glucose lors de la glycogénèse (Eaton et Pooler, 2018). L'unité fondamentale qui assure l'ensemble des fonctions du rein est le néphron, une structure complexe chevauchant le cortex rénal (zone externe) et la médulla rénale (zone interne en forme de pyramide) (O'Callaghan, 2017).

1.1.2 Néphron

Le néphron regroupe l'ensemble des fonctions rénales (O'Callaghan, 2017). Statistiquement, un rein est composé de $0,4 \times 10^6$ à $1,2 \times 10^6$ néphrons (Bendtsen et Nyengaard, 1992). Le néphron est composé de plusieurs sous-structures illustrées à la Figure 2.

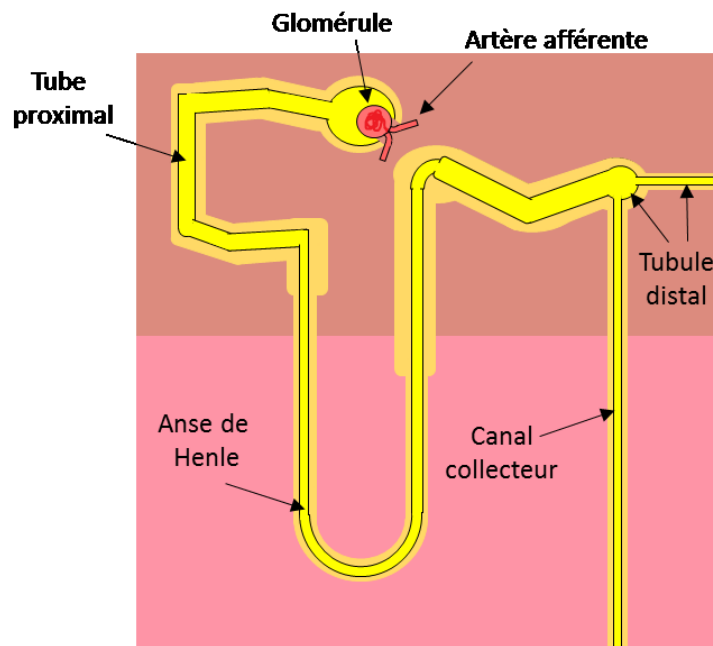


Figure 2. Coupe schématique d'un néphron.

Voici une brève description fonctionnelle de chaque sous-unité: la tête du néphron, nommée le corpuscule rénal ou le glomérule, permet d'amorcer le processus de filtration plasmatique du sang provenant de l'artère afférente. Situé du côté du cortex rénal, le glomérule filtre le plasma en limitant le passage des macromolécules dans l'urine et permet la création d'un liquide riche en sels minéraux (Na^+ , Cl^- , K^+ , HCO_3^-), en eau et en déchets métaboliques, tout en étant pauvre en macromolécules plasmatiques. Puis, le tube proximal permettra la

réabsorption de la majorité des sels minéraux et de l'eau, selon diverses voies spécialisées et passives. L'urine résultant de ce passage reste riche en eau et se concentrera via l'anse de Henle. Située au niveau de la zone médullaire, l'anse permettra une nouvelle réabsorption de l'eau et de divers sels minéraux (Na^+ , Cl^-) grâce au *vasa recta*, un complexe sanguin à proximité de l'anse assurant le maintien de l'osmolarité du système de filtration à ce niveau. Le liquide résultant de ces sections sera déversé dans le tubule distal au niveau du cortex rénal pour rejoindre un canal collecteur (Bellini) regroupant plusieurs tubules rénaux de plusieurs néphrons. À cet endroit, la réabsorption de l'eau, de l'urée et des sels minéraux est dépendante des hormones telles que la vasopressine et l'aldostérone. Les canaux collecteurs permettent de maintenir l'homéostasie et l'osmolarité dans le sang selon les besoins de l'organisme et permettent de créer l'urine finale qui sera éliminée (Maden et Tisher, 1986; O'Callaghan, 2017).

1.1.3 Glomérules

Un glomérule est un circuit de capillaires spécialisés (glomérulaires) qui est rattaché à des cellules mésangiales et entouré par une capsule de Bowman qui est composée d'une couche de cellules pariétales (Al Hussain *et al.*, 2017). Sa fonction est de filtrer près de 150-180 L de plasma par jour grâce à sa barrière perméable spécialisée qui empêche la majorité des macromolécules chargées et/ou de grandes masses de se retrouver dans l'urine (Decramer *et al.*, 2008; O'Callaghan, 2017). La longueur totale des capillaires d'un seul glomérule est de 0,95 cm, ce qui représente environ 19 km pour 2 millions de glomérules et une surface totale de 6,000 cm^2 dont une surface de filtration totale de 516,1 cm^2 (Bohle *et al.*, 1998). La structure de la barrière de filtration glomérulaire est définie en trois feuillets principaux: 1) une couche de cellules endothéliales du côté sanguin (endothélium), 2) une matrice extracellulaire (membrane basale glomérulaire), et 3) une couche de cellules viscérales épithéliales (podocytes) du côté de l'espace urinaire.

1.1.3.1 Endothélium

L'endothélium est une couche cellulaire spécialisée perforée de pores variant de 60-100 nm de diamètre qui permet de diriger le plasma vers la membrane basale glomérulaire. Cette couche contient une grande quantité de glycoprotéines polyanioniques de surface

(sialoprotéines) et semble assurer la perméabilité de certaines macromolécules selon leur charge moléculaire (Rostgaard et Qvortrup, 2002; Rops *et al.*, 2014).

1.1.3.2 Membrane basale glomérulaire

La membrane basale glomérulaire est une matrice extracellulaire qui résulte de la fusion de la membrane basale endothéliale et épithéliale lors du développement fœtal. Elle est séparée par trois couches: la lamina rara interna (adjacente à l'endothélium), la lamina densa (couche centrale) et la lamina rara externe (adjacente aux podocytes). Il est suggéré que la membrane basale glomérulaire est une barrière chargée négativement qui bloque une majorité de macromolécules, dont l'albumine (68000 Da) (Decramer *et al.*, 2008; O'Callaghan, 2017). La membrane est composée de quatre macromolécules majeures: la laminine, le collagène de type IV, le nidogène et l'héparan sulfate protéoglycan. Étant le plus abondant, l'héparan sulfate assure la perméabilité de la membrane par sa charge négative (Timpl, 1989). La membrane basale glomérulaire contient des isoformes protéiques spécifiques et cruciaux pour le développement, la morphologie et la fonction glomérulaire, dont l'ancrage des podocytes (Miner, 2012).

1.1.3.3 Podocytes

Tel qu'illustré à la Figure 3, les podocytes sont de larges cellules viscérales épithéliales hautement différenciées (post-mitotiques) retrouvées à la surface externe des capillaires glomérulaires, au niveau de l'espace de Bowman (espace entre les cellules viscérales et pariétales) (Trimarchi, 2015b). Ils sont fixés à la couche de lamina et au collagène de type IV de la membrane basale glomérulaire à l'aide de molécules d'adhésion, telles que les intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ et $\alpha2\beta1$ (Mathew *et al.*, 2012). Statistiquement, il y a près de 500-800 podocytes par glomérule, ce qui représente près de 1 milliard de podocytes pour les deux reins (Shankland *et al.*, 2014; Trimarchi, 2015b). Les podocytes maintiennent l'intégrité de la barrière glomérulaire (Pierchala *et al.*, 2010). En fait, lors du développement embryonnaire, les podocytes s'entourent autour de la membrane basale et le cytoplasme s'allonge pour créer une organisation complexe d'embranchements interdigitaux entre les podocytes, appelés des pédicelles. Composés de filaments d'actine et de protéines de jonctions ZO-1, les pédicelles forment des espaces de 10 à 60 nm pour créer une fenestration de filtration. Une fine membrane de filtration, composée de plusieurs protéines

membranaires, dont la podocine et la néphrine, relie les pédicelles adjacents qui forment des jonctions serrées (Kerjaschki, 1994; Lehtonen *et al.*, 2004; Maden et Tisher, 2004; Fukasawa *et al.*, 2009). Ces jonctions agissent comme tamis et limitent le passage des macromolécules dans le filtrat glomérulaire.

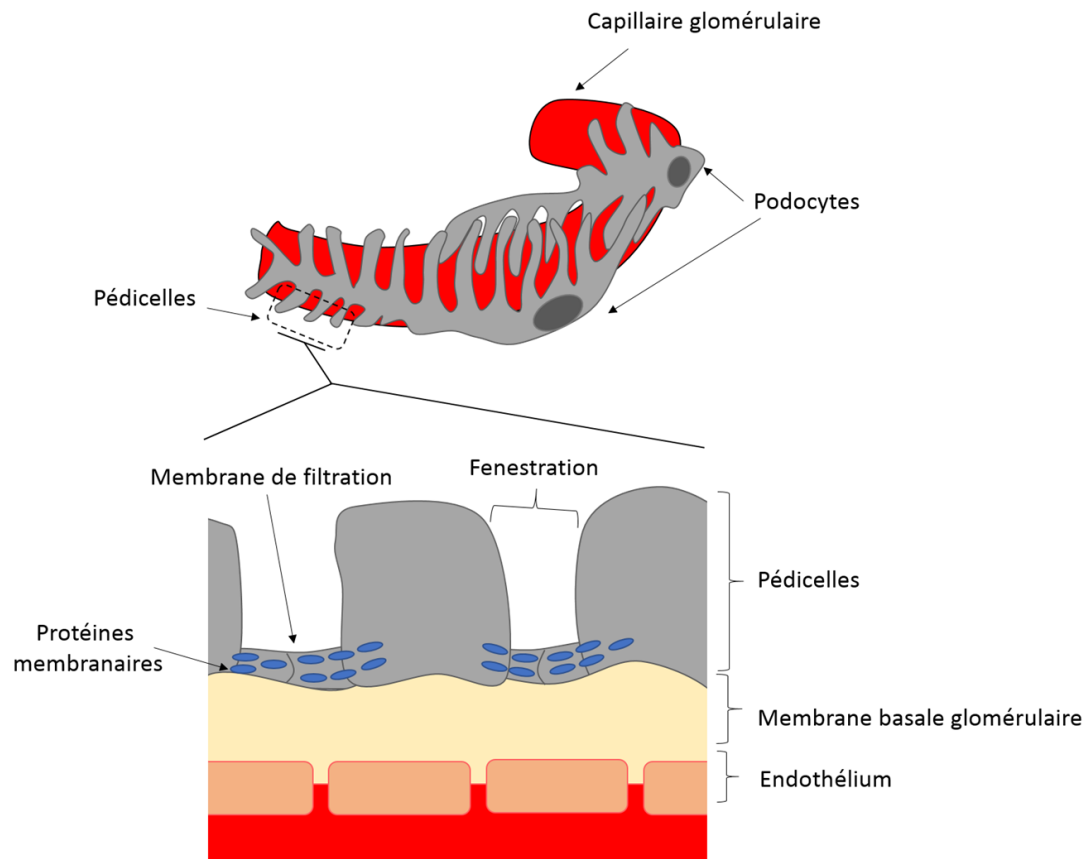


Figure 3. Coupe schématique d'un capillaire glomérulaire et des podocytes.

1.2 Outils conventionnels pour le diagnostic des problèmes rénaux utilisant l'urine

Il a été établi qu'au niveau international, près de 13,4 % de la population présente des maladies rénales chroniques et des millions de personnes décèdent chaque année par le manque d'accessibilité à un traitement abordable (Hill *et al.*, 2016). L'importance d'avoir des indicateurs probants pour assurer un bon diagnostic revêt donc un intérêt majeur. Voici un résumé des outils conventionnels actuellement utilisés pour établir le diagnostic de problèmes rénaux.

1.2.1 Réduction du débit de filtration glomérulaire

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est le volume de plasma filtré par le rein par unité de temps. Présentement, cette mesure est reconnue comme l'un des meilleurs indices de la fonction rénale lors de maladies rénales chroniques. Chez un humain en santé, le débit de filtration glomérulaire estimé est au-dessus de 60 mL/min/1.73 m². Selon les recommandations internationales de 2012 (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), 2012), la mesure du DFG doit être normalisée avec la créatinine urinaire lors des tests préliminaires et avec la cystatine C lors des tests de confirmation. Lors de maladies rénales, le risque de dégradation des reins augmente avec la diminution du débit de filtration glomérulaire tel qu'illustré au Tableau 1.

Tableau 1. Catégorisation et pronostic des dommages chroniques rénaux (adultes).

Catégorisation de DFG	DFG (mL/min/1.73m ²)	Qualification du débit/ Risque de défaillance rénale
G1	≥ 90	Normal/risque faible
G2	60-89	Diminution légère /risque faible
G3a	45-59	Diminution légère à modérée/risque modéré
G3b	30-44	Diminution modérée à sévère/risque modéré
G4	15-29	Diminution sévère/risque élevé
G5	< 15	Insuffisance rénale/risque élevé
DFG: Débit de filtration glomérulaire		

1.2.2 Protéinurie et albuminurie

La protéinurie est définie par la présence élevée de protéines plasmatiques dans l'urine. C'est un bon test pronostique du facteur de risque de troubles rénaux. Puisque l'albumine sérique humaine (HSA) est la protéine majoritairement excrétée dans l'urine (albuminurie), il est aussi possible de la doser dans l'urine pour évaluer les dommages rénaux. La sévérité de l'albuminurie est évaluée en effectuant le dosage de l'albumine sérique dans l'urine (normalisée à la créatinine) (RAC) ou la mesure du débit d'excrétion d'albumine dans l'urine pendant 24 h (DEA). L'albuminurie est un signe plus précoce que la protéinurie. Toutefois, l'augmentation importante de la concentration de protéines ou d'albumine sérique chez un patient augmente ses risques de souffrir d'une défaillance rénale majeure (Lamb *et al.*, 2009;

Kidney Disease : Improving Global Outcomes, 2012). Le Tableau 2 résume l'ensemble des dommages rénaux chroniques selon le DEA et le RAC.

Tableau 2. Pronostic des dommages rénaux selon l'albuminurie (adultes).

Catégorisation	DEA	RAC		Interprétation selon les critères/pronostic
	mg/24 h	mg/mmol	mg/g	
A1	< 30	< 3	< 30	Normale à légèrement élevée/risque faible
A2	30 - 300	3-30	30-300	Augmentation modérée/risque modéré
A3	> 300	> 30	> 300	Augmentation sévère/risque élevé
Débit d'excrétion d'albumine (DEA); Rapport de l'albumine sur la créatinine (RAC)				

1.2.3 Limitations des outils existants

La détection précoce des problèmes rénaux est essentielle pour le monitoring des patients et pour prévenir la détérioration rénale. Malgré les outils en place, certaines atteintes rénales peuvent rester asymptomatiques et engendrer un retard dans le diagnostic tout en augmentant les risques d'insuffisance rénale éventuelle (National Clinical Guideline Centre (NICE), 2014). L'utilisation de la mesure du DFG reste une estimation qui est soumise à plusieurs facteurs, tels que la composition musculaire, les diètes riches en protéines, les suppléments en créatinine, les maladies musculaires, la prise de certains médicaments, la dialyse, l'ethnicité, l'âge, l'obésité et l'interférence avec certaines molécules de la matrice, ce qui entraîne une variabilité non souhaitée des résultats (Kitiyakara *et al.*, 2012; NICE, 2014). L'albuminurie et le DFG ne sont pas toujours des paramètres fiables, même s'ils peuvent avoir un impact majeur lors de la prise de décision d'un traitement. De fait, citons le cas de la maladie de Fabry où la néphropathie est un signe clinique majeur pour l'initiation du traitement et pour arrêter la progression de la maladie (Ortiz *et al.*, 2018). Par contre, il s'avère que d'autres biomarqueurs pourraient être utilisés comme moyens alternatifs pour l'analyse d'une néphropathie, tel le monitoring de la podocyture chez les patients asymptomatiques (Tøndel *et al.*, 2015). Néanmoins, le développement de nouveaux outils de détection pourrait permettre une prise en charge optimale et rapide des patients asymptomatiques et ainsi diminuer les coûts de santé en réduisant le nombre de patients sous dialyse et ceux recevant une greffe rénale (Honeycutt *et al.*, 2013).

1.3 Podocyturie

1.3.1 Physiopathologie

La podocyturie est définie par la présence significative de cellules podocytaires dans l'urine à la suite du détachement des podocytes causé par l'endommagement ou un stress important au niveau de la membrane de la filtration glomérulaire ou des podocytes eux-mêmes (Wiggins, 2010). Il est normal de retrouver une petite quantité de podocytes viables dans l'urine chez un humain en santé. Vogelmann *et al.* ont conclu que par comptage cellulaire, près de 0.5 podocyte/mg de créatinine est normalement perdu tous les jours chez une personne en santé. Cette concentration endogène est causée par les hautes pressions retrouvées au niveau des glomérules qui mènent à un stress de cisaillement sur les podocytes lors de la filtration glomérulaire. Chez un patient atteint d'une maladie glomérulaire, près de 388 podocytes/mg créatinine peuvent être retrouvés dans son urine par jour. (Vogelmann, 2003). Une augmentation de podocytes urinaires a aussi été observée chez les patients atteints de diabète (Nakamura *et al.*, 2000), de glomérulopathie (Hara *et al.*, 1995), de la maladie de Fabry (Trimarchi *et al.*, 2016) et de prééclampsie (Garovic *et al.*, 2007)

Bien que le processus mécanistique d'apparition de la podocyturie ne soit pas totalement compris, deux principaux facteurs semblent menés au détachement des podocytes: 1) l'altération des mécanismes d'adhésion des podocytes à la membrane basale glomérulaire lors de maladies inflammatoires glomérulaires; 2) l'augmentation de la distension mécanique et des forces de cisaillement au niveau des podocytes, telles que l'hypertension glomérulaire, l'hyperfiltration et l'hypertrophie des podocytes avec l'âge (Kriz et Lemley, 2015).

D'autre part, il a été prouvé chez les humains et les modèles animaux qu'une perte importante de podocytes peut mener à la protéinurie glomérulaire, à des problèmes rénaux chroniques et à l'insuffisance rénale (Pagtalunan *et al.*, 1997; Wharram *et al.*, 2005; Craici *et al.*, 2013). L'apparition de ces problèmes serait causée par l'incapacité des cellules podocytaires à se répliquer, car elles sont hautement différenciées, et par la limitation du réarrangement d'actine des podocytes ancrés et adjacents pour couvrir la membrane basale glomérulaire exposée. Ainsi, la progression du détachement podocytaire causerait l'augmentation de l'espacement interpodocytaire et mènerait graduellement à l'insuffisance rénale. Certains

chercheurs croient qu'il existe un mécanisme de recrutement de cellules pariétales de la capsule de Bowman pour régénérer la perte de podocytes, mais cette théorie n'a pas encore été prouvée *in vivo* (Kriz *et al.*, 2013; Trimarchi, 2015b).

1.3.2 Traitement de la podocyture

Aucun traitement n'existe actuellement pour traiter efficacement la podocyture d'un point de vue clinique. Toutefois, la thérapie visant les maladies glomérulaires en ciblant les actines cytosquelettiques des podocytes suscite un intérêt en recherche en vue du développement de médicaments pour la restauration de la structure et la fonction des podocytes (Müller-Deile et Schiffer, 2017).

1.3.3 Protéines urinaires spécifiques d'intérêt

Plusieurs protéines spécifiques aux podocytes comme la podocalyxine, la podocine, la néphrine et la synaptopodine sont d'intérêt pour évaluer la podocyture, car elles ont été étudiées et analysées comme des marqueurs pour le diagnostic de la podocyture (Skoberne *et al.*, 2009). Dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons ciblé deux protéines d'intérêt pour évaluer la podocyture chez les patients et contrôles sains, soit la podocine et la podocalyxine. Ces deux protéines ont d'ailleurs déjà été détectées dans les urines lors de l'imagerie cellulaire pour identifier les podocytes urinaires (Sekulic et Sekulic, 2013).

1.3.3.1 Podocine

La podocine est une protéine de 383 acides aminés de la famille des stomatines (protéines de structure) codée exclusivement par le gène *NPHS2* (OMIM no 604766) localisé sur le chromosome 1q25.2. (Boute *et al.*, 2000). Ayant une structure en épingle à cheveux, elle permet une association avec des lipides membranaires et d'autres protéines, comme la néphrine, pour réguler la perméabilité glomérulaire et former une barrière de filtration glomérulaire entre les pédicelles (Schermer et Benzing, 2009; Volker *et al.*, 2013). Une étude sur des souris transgéniques a démontré que l'intégrité du gène codant est essentielle au maintien de la membrane de filtration. En fait, la mutation du gène *NPHS2* a causé la mort des souriceaux, puisqu'ils souffraient d'insuffisance rénale par l'absence de la membrane de filtration au niveau des podocytes (Roselli *et al.*, 2004). Par ailleurs, 15 % des cas de syndrome néphrotique dans la population brésilienne ont une mutation du *NPHS2* (Guaragna *et al.*, 2015). De plus, il semble que la prévalence des mutations de ce gène pourrait varier

selon les origines ethniques de la population (Bouchireb *et al.*, 2014). Il existe deux isoformes de la podocine. L'isoforme 1 est la protéine complète qui se retrouve au niveau de la membrane cellulaire et de la membrane périphérique. L'isoforme 2 est une variante avec l'absence de la séquence entre l'acide aminé 179 et 246 du domaine central de la prohibitine de la protéine. L'isoforme 2 a été répertorié au niveau du réticulum endoplasmique, mais son rôle n'est pas clairement défini (Volker *et al.*, 2013).

1.3.3.2 Podocalyxine

La podocalyxine est une protéine transmembranaire de type I de 558 acides aminés, glycosylés et sialylés de la famille des sialoprotéines. Elle est codée par le gène *PODXL* (OMIM no 602632) localisé sur le chromosome 7q32.3 (Kershaw *et al.*, 1997). Elle est principalement exprimée au niveau des podocytes, mais aussi par les cellules progénitrices hématopoïétiques (moelle osseuse), l'endothélium vasculaire (parois internes sanguines des vaisseaux sanguins) et les neurones (système neuronal) (Nielsen et McNagny, 2009). La podocalyxine serait aussi potentiellement un marqueur de mauvais pronostic à partir d'échantillons de tissus au niveau de quelques cancers (Kaprio *et al.*, 2014; Heby *et al.*, 2015). Au point de vue rénal, la podocalyxine se retrouve à la surface apicale de la membrane des podocytes (au niveau de l'espace urinaire) (Kerjaschki *et al.*, 1984). Son rôle est d'assurer la morphogénèse et le maintien de l'intégrité structurale des podocytes. C'est une molécule antiadhésive, chargée négativement, qui permet de garder les voies de filtration ouvertes entre les pédicelles grâce à la répulsion de charges à la surface apicale des pédicelles (Takeda *et al.*, 2001). Selon une étude faite sur des souris, la déficience ou la neutralisation de la charge négative de la podocalyxine perturbe l'interdigitalisation des podocytes et alterne la morphologie des podocytes (Nielsen et McNagny, 2009). Il existe aussi deux isoformes de la podocalyxine: l'isoforme 1 est la protéine complète et l'isoforme 2 qui a une délétion de la séquence des acides aminés 236-238 produit par épissage alternatif au niveau du domaine extracellulaire de la protéine (Li *et al.*, 2001).

1.3.4 Stratégies pour évaluer la podocyture

L'évaluation de la podocyture serait une stratégie potentielle permettant l'évaluation précoce des problèmes rénaux (Kikuchi *et al.*, 2015). Pour ce faire, plusieurs approches ont été développées pour tenter de l'évaluer.

1.3.4.1 Marquage par immunofluorescence des podocytes

L'une des stratégies les plus courantes pour évaluer la podocyture est d'effectuer le comptage de podocytes dans l'urine suite à un marquage par immunofluorescence. À l'aide d'un anticorps spécifique ciblant des protéines distinctes reliées aux podocytes, il est possible de marquer les cellules par immunofluorescence et d'en faire le comptage, d'étudier la morphologie des podocytes lors du détachement ou l'apparition d'anomalies lors de pathologies et de comprendre plus en profondeur les mécanismes fondamentaux. Toutefois, l'utilisation du comptage cellulaire par immunofluorescence est une stratégie à risque d'avoir des contaminations par les bactéries. De plus, elle ne permet d'obtenir qu'une quantification relative des podocytes et reste une stratégie laborieuse pour le domaine clinique (Kelder *et al.*, 2012; Trimarchi, 2017).

1.3.4.2 Évaluation de la podocyture par amplification en chaîne par polymérase quantitative

Dans un autre ordre d'idées, des experts ont développé une méthode permettant d'évaluer la podocyture en quantifiant le niveau de l'acide ribonucléique messager (ARNm) spécifique aux protéines podocytaires par amplification en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) (Kelder *et al.*, 2012). La stratégie est basée sur le fait que plus la quantité d'ARNm est augmentée dans l'urine, plus la quantité de podocytes urinaires le sera également, menant alors à une podocyture sévère. Bien que cette stratégie semble robuste, elle ne discrimine pas l'ARN provenant des cellules podocytaires vivantes de celles ayant subi une apoptose. De plus, une limitation importante de cette stratégie est que l'altération de la qualité des ARNm peut mener à une variabilité importante et altérer la robustesse de la méthode (Fukuda *et al.*, 2012).

1.3.4.3 Évaluation de la podocyture par spectrométrie de masse

Une autre voie intéressante et prometteuse pour évaluer la podocyture est de quantifier le niveau de protéines podocytaires urinaires chez les patients en utilisant une fine technologie, soit celle de la spectrométrie de masse en tandem. La stratégie consiste à mesurer la concentration équimolaire des peptides spécifiques reliés aux protéines podocytaires par une méthode de haute résolution possible grâce à la spectrométrie de masse. C'est l'approche qui

a été retenue dans le cadre de ce projet de maîtrise et qui sera présentée dans les prochaines sections.

1.4 Prééclampsie

1.4.1 Introduction et incidence

Les maladies hypertensives lors de la grossesse sont une cause importante de mortalité pour les femmes gestationnelles, soit 11 à 18 % à travers le monde (Say *et al.*, 2014). La prééclampsie est une maladie hypertensive gestationnelle accompagnée de problèmes multisystémiques (Mol *et al.*, 2016). L'incidence globale de la maladie varie entre 2-8 % dans le monde et reste l'une des causes majeures de mortalité et de morbidité maternelles et fœtales dans le monde (Abalos *et al.*, 2013; Say *et al.*, 2014). Malgré les améliorations des protocoles de prise en charge depuis les dernières décennies, l'incidence de la maladie n'a pas changé. Selon les dernières statistiques de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sur les femmes prééclampsiques, 0,5 % des mères vont en mourir et 4 % vont survivre de justesse. Au niveau fœtal, 10 % vont mourir, 31 % seront des nouveau-nés prématurés et 25 % devront être hospitalisés aux soins intensifs en néonatalogie (Abalos *et al.*, 2014).

1.4.2 Physiopathologie

La physiopathologie de la maladie n'est pas complètement connue, mais une placentation anormale semble être la source initiale du problème. En fait, lors d'une grossesse normale, les trophoblastes participent à plusieurs mécanismes essentiels, dont l'implantation du blastocyste par l'invasion des cytotrophoblastes à l'intérieur du myomètre, la muqueuse de la paroi utérine. Cette invasion permet le remodelage des artères spiralées utérines pour qu'elles puissent perdre leur endothélium vasculaire et devenir insensibles aux molécules vasoconstrictrices maternelles. Ainsi, ces artères assurent l'approvisionnement du placenta et du fœtus en nutriments à partir du sang maternel et de la perfusion du placenta (Soares *et al.*, 2014). Lors d'une prééclampsie, des experts ont démontré que l'invasion des cytotrophoblastes pouvait être altérée et affecterait partiellement le remodelage dans plusieurs sections des artères spiralées. Par conséquent, plusieurs endroits au niveau de ces artères resteraient sensibles à la vasoconstriction et seraient responsables de l'augmentation de la pression artérielle utérine pour mener à l'hypoxie placentaire et à l'hypoperfusion placentaire. En réponse à ce changement, un déséquilibre de molécules angiogéniques,

comme une augmentation de la tyrosine kinase-1 (sFlt-1) en circulation, aurait lieu et causerait des problèmes vasculaires et des dommages systémiques chez la mère et le fœtus (Uzan *et al.*, 2011; Fisher, 2016). Cette théorie est la plus acceptée, mais l'étiologie reste inconnue. Toutefois, la prédisposition génétique, une altération immunologique, la libération de produits oxydatifs et l'infection de composants microbiens dormants, non détectés par les outils conventionnels seraient des causes potentielles de la prééclampsie (Haram *et al.*, 2014; Sicar *et al.*, 2015; Kell et Kenny, 2016).

1.4.3 Risques relatifs

Malgré les limitations de la connaissance des causes exactes de la maladie, les spécialistes ont observé qu'il existe des facteurs majeurs qui tendent à augmenter le risque relatif qu'une femme puisse souffrir de prééclampsie (Tableau 3). Toutefois, l'étude de ces facteurs permet seulement de diagnostiquer 30 % des femmes atteintes de la prééclampsie (Leslie *et al.*, 2011). D'autre part, bien que faiblement associées, mais non limitées, l'origine ethnique et la disposition socio-économique pourraient aussi avoir un impact, puisqu'il a été révélé que le risque relatif de prééclampsie avait une tendance à être plus élevé chez les personnes d'origine africaine (Uzan *et al.*, 2011; English *et al.*, 2015).

Tableau 3. Principaux facteurs de risques relatifs à la prééclampsie.

Facteurs de risque	Moyenne (min-max) Intervalle de confiance 95%
Syndrome antiphospholipidique	9.72 (4.34-21.75)
Prééclampsie lors d'une ancienne grossesse	7.19 (5.85-8.83)
Diabète insulino-dépendant	3.56 (2.54-4.99)
Grossesse multiple	2.93 (2.04-4.21)
Nulliparité	2.91 (1.28-6.61)
Historique familial de prééclampsie	2.90 (1.70-4.93)
Obésité	2.47 (1.66-3.67)
Âge > 40 ans	1.96 (1.34-2.87)
Hypertension chronique	1.38 (1.01-1.87)

1.4.4 Manifestations cliniques caractéristiques de la prééclampsie

Étant une maladie multisystémique potentiellement causée par une placentation anormale, plusieurs signes et symptômes de la prééclampsie peuvent se présenter. Malheureusement, les femmes sont majoritairement asymptomatiques et diagnostiquées tardivement lors d'un examen prénatal de routine (Mol *et al.*, 2016).

1.4.4.1 Critères pour le diagnostic et la sévérité

Avant 2014, la présence de la protéinurie était un critère qui semblait probant pour la spécificité de la maladie, mais des études semblent démontrer que la protéinurie est une mesure potentiellement inexacte (Brown, 2012). Afin d'éviter d'exclure une femme asymptomatique, atypique ou tardive dans les critères de diagnostic, la société internationale sur l'étude de l'hypertension dans la prééclampsie (ISSHP) a élargi les critères de diagnostic tel qu'indiqué dans le Tableau 4 (Tranquilli *et al.*, 2014). La présence de signes et de symptômes suivants, combinés aux critères pour le diagnostic de la maladie, sont associés à la variante sévère de la maladie: hypertension artérielle sévère (hypertension systolique ≥ 160 mmHg ou diastolique ≥ 100 mmHg), thrombocytopénie $< 100.000/\mu\text{L}$, transaminases hépatiques deux fois plus élevées, syndrome de HELLP (hémolyse, enzymes hépatiques élevées, faible numération plaquettaire), insuffisance rénale, défaillances neurologiques ou œdème aigu pulmonaire (Lambert *et al.*, 2014).

Tableau 4. Critères permettant le diagnostic de la prééclampsie.

Hypertension développée après 20 semaines de gestation combinée à:	
1)	Protéinurie : ≥ 300 mg protéines urinaires/jour ou ≥ 30 mg/mmol (protéines urinaires/créatinine)
2)	Autres dysfonctions d'organes maternels : <ul style="list-style-type: none">a. Insuffisance rénale (créatinine ≥ 90 $\mu\text{mol/L}$)b. Insuffisance hépatique (transaminases élevées et/ou quadrant supérieur droit sévère ou douleur épigastrique)c. Complications neurologiques (ex.: éclampsie, AVC, cécité, etc.)d. Complications hématologiques (ex.: syndrome de HELLP)
3)	Dysfonction utéroplacentaire <ul style="list-style-type: none">a. Restriction de la croissance fœtale

1.4.4.2 Problèmes vasculaires

L'un des problèmes vasculaires les plus évidents lors de la prééclampsie est l'hypertension artérielle. L'augmentation de la tension artérielle n'est pas un critère exclusif à la maladie et peut se présenter dans d'autres complications hypertensives durant la grossesse. En soi, l'hypertension lors de la grossesse augmente le risque de développer de l'hyperlipidémie, du diabète et de l'hypertension chronique, ce qui peut prédisposer ces femmes à développer des problèmes cardiaques et vasculaires à long terme. Une autre conséquence à long terme qui a été observée est qu'une restriction de la croissance intra-utérine causée par la prééclampsie pourrait augmenter les risques cardiovasculaires chez les nouveau-nés par une altération du myocarde. Dans le cas de la prééclampsie, l'hypertension se présentera subitement et généralement après 20 semaines de grossesse et s'estompera quelques jours après l'accouchement (Herrera-Garcia et Contag, 2014).

1.4.4.3 Problèmes rénaux

Le système rénal est le système souvent le plus touché lors de la prééclampsie. Par contre, la grossesse en soi change naturellement l'efficacité et la morphologie des reins. Normalement, le débit de filtration glomérulaire sera 40 % plus élevé lors d'une grossesse sans complications pour revenir à la normale au plus tard 1 mois après l'accouchement (Krutzn et al., 1992). Lors d'une prééclampsie, la placentation anormale mène à un déséquilibre des protéines angiogéniques, comme l'augmentation du sFlt1 soluble, une altération du système régulateur de la rénine, de l'angiotensine et de l'aldostérone et à un relâchement de produits de stress oxydatif. Ceux-ci causent des dommages au niveau des glomérules, affectent la perméabilité des capillaires glomérulaires et réduisent la surface de filtration, ce qui peut entraîner une diminution du débit de filtration glomérulaire (Hussein et Lafayette, 2014). Les femmes souffrant de prééclampsie seront de 4 à 15 fois plus à risque de développer une insuffisance rénale à long terme (Wang et al., 2013). Les patientes peuvent présenter de la protéinurie soit la présence de plus de 300 mg de protéines urinaires/jour dans l'urine, mais ce n'est pas toujours le cas (Brown, 2012). D'autre part, la prééclampsie peut aussi se présenter avec de la podocyture. Des études ont révélé la présence de podocytes urinaires à partir de 35 semaines de gestation et jusqu'à 1 mois après l'accouchement chez les femmes prééclampsiques. Dans ces mêmes études, il a été révélé que la podocyture peut se présenter

malgré l'absence de protéinurie et d'hypertension, mais ces résultats doivent être répétés à plus grande échelle (Aita *et al.*, 2009; White *et al.*, 2014).

1.4.5 Traitements

Actuellement, le seul traitement efficace est l'accouchement du fœtus pour retirer le placenta de l'utérus. Toutefois, les manifestations cliniques peuvent prendre de 2 jours à 6 semaines postpartum pour disparaître. La raison de cet écart de temps pourrait être expliquée par un retrait incomplet de fragments de placenta qui maintient les effets de la prééclampsie (American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), 2013). Fait intéressant, aucune différence significative n'a été démontrée entre l'accouchement par les voies naturelles ou par une césarienne d'urgence, mais le taux de césarienne est significativement plus élevé dans le groupe de femmes souffrant de prééclampsie comparativement aux femmes saines (Pacher *et al.*, 2014). Les obstétriciens ont défini que le moment choisi de l'accouchement est basé, en premier lieu, selon les conditions de santé de la mère. Il a été suggéré d'attendre au minimum à 34 semaines de gestation pour les cas les plus sévères et à 37 semaines pour les cas les plus légers. Par contre, pour les cas plus sévères, une provocation avant 34 semaines peut être indiquée (Stocks, 2014). L'utilisation de suppléments nutritionnels et d'agents pharmaceutiques comme moyens préventifs pour réduire l'incidence de la prééclampsie a été étudiée. Une méta-analyse a démontré que la diète alimentaire et le style de vie ont un impact sur l'incidence de la maladie (Allen *et al.*, 2014), mais d'autres études ont révélé que certains apports en vitamines, minéraux, et en gras polyinsaturés ne réduisent pas le risque de prééclampsie (Mol *et al.*, 2016). Seule l'aspirine à faible dose semble être un moyen préventif concluant pour contrôler l'hypertension sévère et réduire les risques de manifestations cliniques sévères prééclampsiques (Xu *et al.*, 2015).

1.4.6 Recherche de nouveaux outils de prédiction de la prééclampsie

Pour le moment, la prédiction de la prééclampsie est un enjeu important pour prendre en charge rapidement les patientes atteintes et ce, en vue de permettre la découverte de nouvelles voies thérapeutiques pouvant mieux prévenir ou même traiter la maladie. Actuellement, l'hypertension, la protéinurie et les manifestations cliniques ne se présentent pas toujours hâtivement (Mol *et al.*, 2016). De plus, ces outils n'offrent pas toujours la précision pour distinguer la prééclampsie de d'autres maladies très similaires (Morton, 2016). Nous

présenterons maintenant quelques stratégies qui ont été développées pour prédire la maladie plus rapidement.

1.4.6.1 Étude des artères utérines par la méthode de Doppler

Le test de Doppler est une analyse par imagerie en deux dimensions permettant l'étude du débit du sang dans les artères et les veines utérines à l'aide d'ultrasons. Des études ont été réalisées aux différents trimestres de grossesse en combinant des biomarqueurs découverts à l'époque pour la détection hâtive de la prééclampsie. Bien que l'utilisation du test de Doppler lors du premier et second trimestre semble prometteuse, les études entreprises présentent de grands biais, manquent de robustesse, détectent difficilement les patientes prééclampsiques asymptomatiques et sont souvent limitées par un faible échantillonnage. Toutefois, dans certaines études, la combinaison du Doppler et des analyses du sérum a offert des prédictions de 95 à 100 % (Spencer *et al.*, 2007; Plasencia *et al.*, 2008). Certes, l'utilisation de cet outil pour le dépistage de la prééclampsie devrait être de nouveau vérifiée avec d'autres biomarqueurs et de plus grandes cohortes pour réévaluer son potentiel (Lovgren *et al.*, 2010).

1.4.6.2 Quantification des facteurs angiogéniques

Lors de la prééclampsie, un déséquilibre des facteurs angiogéniques a été associé au problème de placentation. Des molécules provenant de la famille du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), comme le sFlt-1, semblent être des molécules prometteuses pour diagnostiquer la maladie. L'inactivation de VEGF cause la mort embryonnaire et la malformation vasculaire chez les souris. Chez l'humain, lorsque le VEGF est inhibé, il a été observé que ces patients souffraient d'hypertension et de protéinurie (Levine *et al.*, 2004). D'autre part, puisque le sFlt-1 agit comme antagoniste au VEGF, un surplus de production du sFlt-1 cause l'inhibition de l'interaction de VEGF et du facteur de croissance placentaire (PlGF) et mène à la dysfonction des cellules endothéliales et à la vasoconstriction artérielle chez la mère (Maynard *et al.*, 2003). Plusieurs études ont observé une augmentation de sFlt-1 et une diminution de PlGF chez les femmes atteintes de prééclampsie (Jardim *et al.*, 2015). Malheureusement, l'OMS a démontré que l'analyse des biomarqueurs angiogéniques lors des 20 premières semaines de gestation ne permet pas de prédire adéquatement le développement de la prééclampsie et que la spécificité et sensibilité sont relativement faibles entre 20 à 25 semaines de gestation (Widmer *et al.*, 2015).

1.4.6.3 Évaluation de la podocyture pour la prééclampsie

La podocyture est présentement évaluée comme un signe potentiel pour le diagnostic de la prééclampsie en l'absence de signes cliniques conventionnels et pour le pronostic de la maladie pour réduire la mortalité et la morbidité. Des stratégies par comptage cellulaire, qPCR et spectrométrie de masse ont été développées.

Tout d'abord, une étude longitudinale a démontré que la podocyture pouvait se présenter avant la protéinurie et avant les manifestations cliniques de la prééclampsie. Cette étude a permis de conclure que l'évaluation de la podocyture par le comptage des podocytes urinaires était une stratégie ayant une plus grande spécificité et sensibilité que l'analyse immunologique de trois facteurs angiogéniques, soit l'engoglin, le PIGF et le sFlt-1 à 27 et 39.5 semaines de gestation (Craici *et al.*, 2013). Toutefois, une autre étude ayant une méthodologie similaire de comptage de podocytes et qui incluait des femmes prééclampsiques sans albuminurie et des contrôles pathologiques de femmes enceintes ayant des complications autres que la prééclampsie (diabète gestationnel, lupus érythémateux systémique et maladies rénales chroniques) a conclu que l'étude précédente surestimait la sensibilité et la spécificité de la méthodologie. Les auteurs ont mentionné que la podocyture pouvait se présenter dans d'autres complications cliniques et ne suggérait pas l'évaluation de la podocyture pour diagnostiquer la prééclampsie. Par contre, cette étude était limitée à cause d'un faible échantillonnage (Belinda *et al.*, 2014). Néanmoins, ces deux études en viennent à des conclusions différentes. Nous croyons que la méthodologie de comptage des podocytes peut être mise en cause, puisque cette stratégie est à risque de contamination et ne permet qu'une quantification relative, tel qu'expliqué précédemment.

Une méthode de quantification par qPCR a permis d'amplifier et de mesurer la concentration en ARN messager du gène de la néphrine et de la podocine chez les femmes prééclampsiques et de comparer avec des contrôles. Malgré sa rapidité d'analyse (4 heures), cette méthode est très sensible aux contaminations, tel qu'expliqué précédemment (Kelder *et al.*, 2012).

D'autre part, la podocine chez les femmes atteintes de la prééclampsie a été quantifiée par spectrométrie de masse pour évaluer la podocyture (Garovic *et al.*, 2013). En bref, ils ont

digéré enzymatiquement le culot de 50 mL d'urine des patients, analysé les peptides spécifiques aux podocytes et ont constaté des élévations importantes chez les femmes prééclampsiques comparativement aux grossesses normotensives. Malgré des observations intéressantes, cette méthode comporte plusieurs limitations. Premièrement, le peptide sélectionné pour la méthode contient une glutamine en N-terminal qui risque de former un pyroglutamate cyclique et causer de la variabilité lors de la quantification (Khandke *et al.*, 1989). Deuxièmement, l'absence d'étape de carbamidométhylation lors de la préparation de l'échantillon peut affecter la quantité de peptides produits lors de la digestion enzymatique et mener à une variabilité au niveau des résultats (Hustoft *et al.*, 2012). Troisièmement, l'utilisation d'un standard interne non clivable qui ne permet pas de corriger la digestion enzymatique incomplète et qui cause une sous-estimation de la quantité réelle de protéines dans l'échantillon (Scott *et al.*, 2015) représente une limitation majeure.

Toutefois, bien que la podocyturie soit un signe prometteur de dommages rénaux et que plusieurs méthodes aient été développées pour évaluer la podocyturie chez les femmes atteintes de prééclampsie, il reste que des améliorations méthodologiques doivent être apportées. Une méthode robuste, fiable et sans ambiguïté pour évaluer les signes de dommages rénaux qui serait applicable au domaine clinique est à envisager pour permettre une prise en charge précoce de ces patientes.

1.5 Maladie de Fabry

1.5.1 Maladies génétiques et leur transmission

La maladie de Fabry (OMIM no 301500) est une maladie génétique qui est causée par des mutations du gène *GLA*. La mutation d'un gène peut mener à une perturbation métabolique et causer des problèmes systémiques. La gravité des maladies génétiques dépend du type de mutation, de la localisation de la mutation et de l'impact de la mutation sur le métabolisme. Il existe plusieurs types de mutations comme les mutations non-sens, faux-sens, et les indel qui peuvent mener à une insertion ou à une délétion. D'autres mutations peuvent mener à un réarrangement ou une duplication d'une séquence d'acide désoxyribonucléique (ADN) et à modifier les protéines synthétisées (Figure 4). (Fletcher et Hickey, 2013).

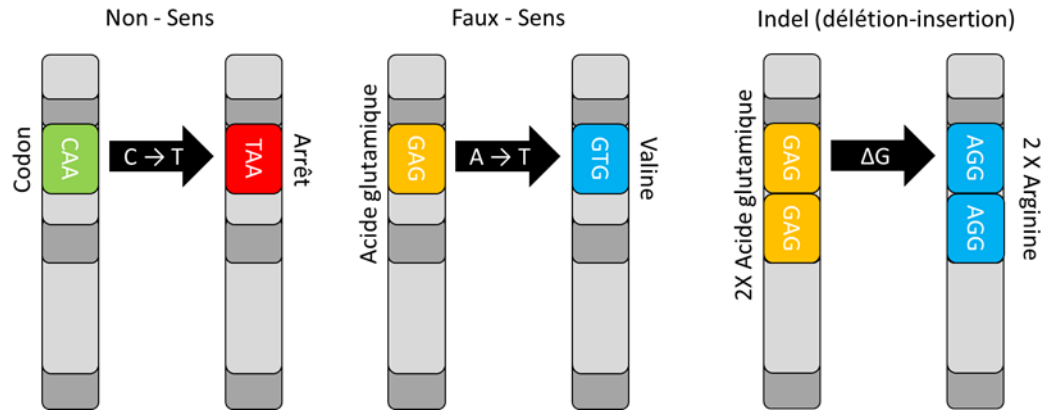


Figure 4. Exemples de mutations au niveau d'un gène.

Une maladie génétique humaine peut être transmise d'une génération à une autre si la mutation menant à la maladie se retrouve au niveau des cellules germinales, soit les cellules reproductives haploïdes qui sont les spermatozoïdes et les ovules. Il existe 3 types de transmission d'une maladie génétique: la transmission autosomique dominante, la transmission autosomique récessive et la transmission liée à l'X. La maladie de Fabry est une maladie dont la transmission est liée à l'X. Ce type de transmission survient lorsque la mutation du gène menant à la maladie est présente sur le chromosome X. Pour les hommes, il suffit que l'allèle muté soit au niveau du chromosome X transmis pour être atteint de la maladie tandis que les femmes seront majoritairement porteuses de la maladie (Figure 5) (Fletcher et Hickey, 2013). Par contre, occasionnellement, des femmes porteuses

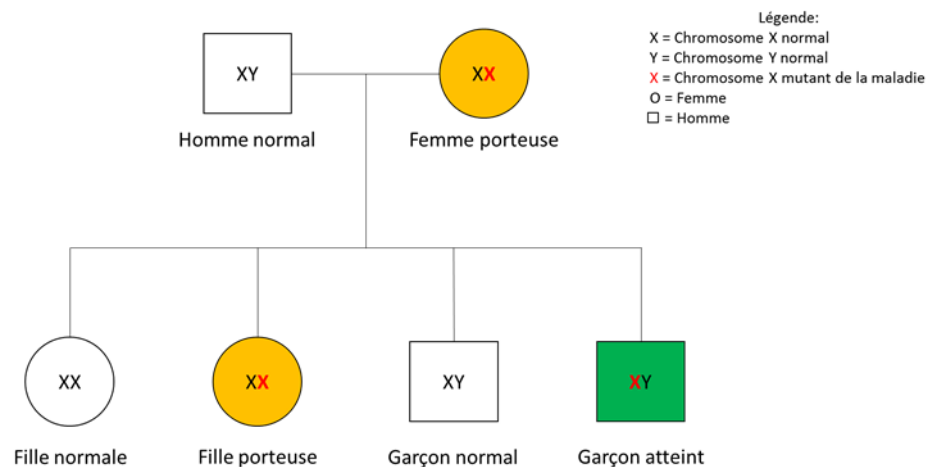


Figure 5. Transmission d'une maladie génétique liée à l'X, si la femme est porteuse du gène muté.

présenteront des symptômes classiques à cause de l'inactivation au hasard du chromosome X, d'un réarrangement chromosomique, ou d'un autre mécanisme inconnu (Echevarria *et al.*, 2016; Juchniewicz *et al.*, 2018).

1.5.2 Maladies lysosomales

La maladie de Fabry fait partie de la famille des maladies lysosomales. Ces maladies sont des maladies métaboliques héréditaires de surcharge caractérisées par une accumulation intra-lysosomale de macromolécules non métabolisées (Platt et Walkley, 2004). Les lysosomes sont des organites des eucaryotes retrouvés au niveau du cytosol qui assurent l'intégrité fonctionnelle cellulaire par le recyclage de plusieurs macromolécules. Provenant de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, les lysosomes contiennent plusieurs types d'enzymes hydrolytiques telles que des lipases, protéases, nucléases, glycosidases, phosphatases et sulfatases (Davidson et Vander Heiden, 2017). Une altération dans la régulation ou la fonction des lysosomes induit l'accumulation progressive de molécules non métabolisées au niveau des cellules, tissus et organes. Ces changements peuvent causer la modification de plusieurs processus cellulaires au niveau de la régulation du pH des lysosomes, l'endocytose, la maturation des vésicules, l'autophagie et l'exocytose. Plus de 50 maladies de surcharge lysosomale sont répertoriées. Elles sont généralement causées par des mutations qui sont transmises majoritairement de façon autosomique récessive, mais parfois liées à l'X (trois sont liées à l'X, soit la maladie de Fabry, la maladie de Hunter (OMIM no 309900) et la maladie de Danon (OMIM no 300257). L'incidence collective est de 1:7 000 à 1:250 000 selon les études (Vitner *et al.*, 2010; Biffi *et al.*, 2016). Ces maladies sont classifiées traditionnellement en 6 groupes qui sont résumés à la Figure 6.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous attarderons principalement aux lipidoses. Les lipidoses sont principalement des altérations de sphingolipides perturbant le métabolisme des glycosphingolipides. La sous-classification des glycosphingolipidoses est basée selon le premier sucre lié à un céramide, soit un glucose (glucosylcéramide) ou un galactose (galactosylcéramide) (Platt et Walkley, 2004).

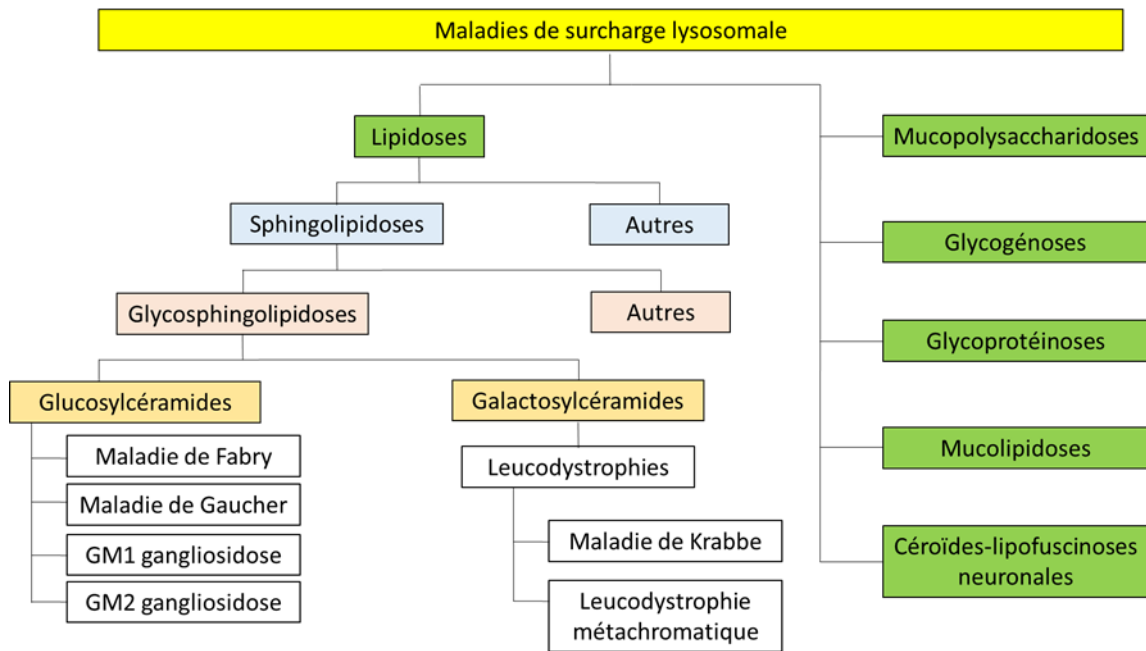


Figure 6. Classification traditionnelle des maladies de surcharge lysosomale.

1.5.3 Définition et physiopathologie de la maladie de Fabry

Tel que mentionné précédemment, la maladie de Fabry est une maladie génétique de surcharge lysosomale, panethnique, liée à l’X. Elle est causée par des mutations du gène *GLA* (Xq22.1) qui encode l’enzyme alpha-galactosidase A (α -Gal A, EC 3.2.1.22). Cette enzyme est responsable de l’hydrolyse des résidus alpha-D-galactose incluant les oligosaccharides de galactose (α -gal et β -gal) et des galactolipides. La déficience ou l’absence d’activité catabolique de l’ α -Gal A cause l’accumulation de molécules telles que le globotriaosylcéramide (Gb₃), le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) et le galabiosylcéramide (Ga₂) et leurs isoformes/analogues respectifs (Figure 7) dans les organes, tissus et liquides biologiques menant aux manifestations de la maladie (Auray-Blais *et al.*, 2012a; Auray-Blais *et al.*, 2012b, Auray-Blais et Boutin, 2012c; Boutin *et al.*, 2012; Dupont *et al.*, 2013; Auray-Blais *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2015; Abaoui *et al.*, 2016; Boutin *et al.*, 2016; Provençal *et al.*, 2016; Auray-Blais *et al.*, 2017; Boutin *et al.*, 2017; Toupin *et al.*, 2018).

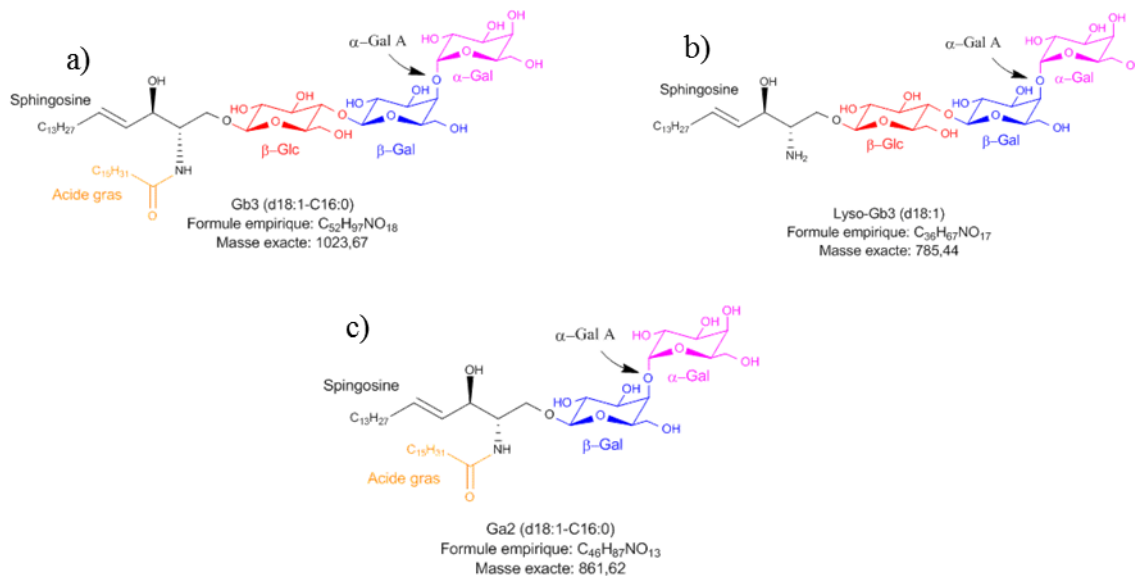


Figure 7. Structures chimiques et sites de clivage de l' α -Gal A: a) Globotriaosylcéramide, b) Globotriaosylsphingosine, et c) Galabiosylcéramide.

Plus de 770 mutations du gène *GLA* menant à la maladie sont déjà répertoriées (Human Gene Mutation Database (HGMD), 2019). Le phénotype de la maladie de Fabry peut être variable selon la mutation et le sexe. Un patient peut souffrir de troubles cliniques importants au niveau de plusieurs organes comme le cerveau, le cœur et les reins et aussi l'endothélium vasculaire (Hasholt *et al.*, 2017; Perratta *et al.*, 2017). La prévalence globale de la maladie est variable. De fait, à Taipei, Taïwan, la prévalence est de 1:1500 hommes, tandis qu'aux États-Unis, dans le Missouri, et au nord-ouest de l'Italie, la prévalence varie de 1:2 900 à 1:3 100, respectivement à cause d'un effet fondateur (Spada *et al.*, 2006; Auray-Blais *et al.*, 2017; Hsu et Niu, 2018). D'autres endroits comme l'Australie, les Pays-Bas et le Portugal ont une prévalence de 1:117000, 1:468 000 et 1:833 000, respectivement (Schiffman *et al.*, 2016). De plus, bien que la transmission génétique soit liée à l'*X* et que les hommes soient majoritairement atteints de la maladie, les femmes peuvent développer des manifestations cliniques similaires avec une réduction de la qualité de vie aussi importante (Arends *et al.*, 2017). Plusieurs moyens existent pour ralentir la progression de la maladie, mais il n'existe pas de traitements qui permettent le rétablissement complet des patients (Tøndel *et al.*, 2015).

1.5.4 Manifestations cliniques

1.5.4.1 Forme classique et forme tardive

Cliniquement, la maladie de Fabry se présente sous deux formes principales: classique et tardive. Les patients atteints de la forme classique sont associés à l'absence ou une diminution sévère (<1% de la moyenne normale) de l'activité enzymatique de α -Gal A combinée avec la présence de manifestations cliniques caractéristiques de la maladie (Ortiz *et al.*, 2018). Selon l'âge du patient, la maladie peut progresser avec plusieurs symptômes (Tableau 5).

Tableau 5. Symptômes classiques chez les patients atteints de la maladie de Fabry.

Enfants (4-16 ans)	Jeunes adultes (17-30 ans)	Adultes (>30 ans)
<ul style="list-style-type: none">- Acroparesthésie- Douleur- Angiokératomes- Phénomène de Raynaud- Cornée verticillée- Surdité- Dyshidrose ou anhidrose	<ul style="list-style-type: none">- Angiokératomes- Protéinurie- Œ��d��me- Fièvre- Dyshidrose- Lympho��d��me- Sensibilité à la chaleur- Diarrhée	<ul style="list-style-type: none">- Problèmes cardiaques- Insuffisance rénale- Accident vasculaire cérébral

Dans le cas de la forme tardive, les patients ont une activité résiduelle de l' α -Gal A qui est variable et peuvent présenter les mêmes manifestations cliniques que la forme classique, mais de manière plus atténuée, ce qui peut retarder le diagnostic ou l'initiation des traitements (Mehta et Widmer, 2006).

1.5.4.2 Problèmes rénaux

Les problèmes rénaux sont l'une des causes importantes de décès chez les patients ayant la forme classique de la maladie de Fabry, puisque les reins sont parmi les organes subissant le plus d'accumulation de Gb₃, telle que les résultats le montrent au niveau d'une étude animale (Provençal *et al.*, 2017). Près de 10% des garçons et 17% des jeunes filles atteintes de la maladie auront des signes de protéinurie et 26% des adultes atteints ont présenté une réduction du débit de filtration. Chez les patients atteints de la maladie de Fabry, l'insuffisance rénale touche plus souvent les hommes adultes d'une trentaine d'années et plus rarement les femmes (Colpart et Félix, 2017). De plus, de la vacuolisation des podocytes des cellules mésangiales et endothéliales a été observée chez les patients souffrant d'une variante génétique de la maladie de Fabry causant des problèmes rénaux. La vacuolisation au niveau du cytoplasme des cellules est un signe de dommages cellulaires. Ces dommages seraient

causés par l'accumulation du Gb₃ au niveau du tissu rénal dont les podocytes (Najafian *et al.*, 2011; Del Pino *et al.*, 2018). Progressivement, les dommages aux podocytes mèneraient à l'altération de la membrane glomérulaire et à l'apparition de la protéinurie (Del Pino *et al.*, 2018).

1.5.5 Traitements

1.5.5.1 Thérapie enzymatique de remplacement

La thérapie enzymatique de remplacement (TER) consiste à infuser une enzyme recombinante imitant les propriétés de l'enzyme déficiente pour traiter la maladie ciblée. Pour la maladie de Fabry, il existe deux enzymes recombinantes permettant de traiter la maladie: agalsidase alfa (Replagal[®], Shire Human Genetic Therapies, maintenant Takeda Pharmaceutical, Osaka, Japon) donnée par infusion à une dose de 0.2 mg/kg de poids du patient aux 2 semaines et agalsidase beta (Fabrazyme[®], Sanofi Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA) aussi donnée par infusion à une dose de 1 mg/kg de poids du patient à toutes les deux semaines. Des études ont démontré que les deux thérapies présentent des propriétés biochimiques similaires et sont comparables au niveau de la structure, à l'exception de quelques différences au niveau de la glycosylation qui intervient au niveau des récepteurs mannose-6-phosphate (Pisani *et al.*, 2012). Il a été démontré que la réduction du Gb₃ des podocytes corrélait avec l'augmentation de la dose de la thérapie, mais que le traitement n'empêchait pas la progression de la maladie (Tøndel, 2015). Il a été tout de même observé que la progression des complications est généralement ralentie et que les symptômes observés chez les patients étaient stabilisés suite à la TER (Schiffmann *et al.*, 2007; Cabrera *et al.*, 2017).

1.5.5.2 Thérapie par chaperons

Une autre thérapie du patient atteint de la maladie de Fabry est la thérapie orale à long terme par chaperons, soit des capsules de chlorhydrate de migalastat (123 mg par jour, Galafold[™], Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ). Cette molécule est un analogue du galactose terminal du Gb₃ qui peut se lier de manière sélective et réversible au site actif de l' α -Gal normal et muté. Ce chaperon pharmacologique permet de stabiliser l'enzyme avant son passage au niveau du réticulum endoplasmique lorsque l'enzyme a un mauvais repliement causé par une mutation au niveau du gène *GLA*. En absence de cette stabilité, l'enzyme mutée ayant un

mauvais repliement serait dégradée et ne pourrait pas se rendre aux lysosomes pour cataboliser les différents substrats. (Macario et Conway de Macario, 2007; Benjamin *et al.*, 2017). Une fois l'enzyme rendue au niveau du lysosome, le chaperon se dissociera de l'enzyme à cause du milieu acide de l'organite et de la grande concentration de substrat (Germain *et al.*, 2013; Markham, 2016). Il est rapporté que 269 mutations du gène *GLA*, majoritairement des mutations faux-sens, seraient propices à la thérapie par chaperons pour les patients Fabry (Benjamin *et al.*, 2012). Les derniers résultats ont montré une amélioration potentielle de la fonction rénale à long terme et une réduction significative du Gb₃ au niveau des podocytes avec une diminution des signes de dommages podocytaires (Germain *et al.*, 2016; Mauer *et al.*, 2017). La mise en marché au Canada du GalafoldTM a été autorisée par Santé Canada le 5 septembre 2017 (Santé Canada, 2019).

1.5.5.3 Thérapie génique

La thérapie génique est une stratégie expérimentale visant à traiter les patients atteints d'une maladie génétique via la modification du profil d'expression génétique. La procédure consiste à remplacer un gène défectueux par un gène fonctionnel via une transgénèse virale dans des cellules *ex vivo* du patient (ex. cellules somatiques) qui seraient transplantées dans le patient. Ainsi, les cellules transplantées permettraient l'expression du gène fonctionnel en principe, pour le reste de la vie du patient (Soleimani *et al.*, 2015). L'utilisation d'un vecteur non viral, telles que des nanoparticules lipidiques, est aussi à l'étude dans le cadre de la thérapie génique (Del Pozo-Rodriguez *et al.*, 2016). Plusieurs résultats positifs ont été démontrés à partir de modèle murin pour le traitement de plusieurs maladies de surcharge lysosomale (Aronovich et Hackett, 2016). En 2017, grâce à une première mondiale au Canada, un homme atteint de la maladie de Fabry a pu recevoir la thérapie génique dans le cadre d'un projet de recherche pancanadien (Alberta Health Services, 2017). L'étude est en cours et sera publiée sous peu.

1.5.5.4 Thérapie par réduction de substrat

Une voie thérapeutique explorée pour les maladies de surcharge lysosomale est la réduction du substrat. Le principe consiste à utiliser un médicament permettant d'inhiber partiellement la biosynthèse des molécules qui s'accumulent en l'absence de l'enzyme lysosomale touchée par une mutation génétique. Cette stratégie permettrait de réduire les effets dus à

l'accumulation de substrat. Présentement, des médicaments permettant cette thérapie chez les patients atteints de la maladie de Fabry sont en cours d'évaluation (Coutinho *et al.*, 2016; Guérard *et al.*, 2018).

1.5.6 Évaluation de la podocyturie chez les patients atteints de la maladie de Fabry

Tel que présenté précédemment, la thérapie enzymatique de remplacement administrée chez les patients ralentit la progression de la maladie et peut avoir un impact positif sur la qualité de vie des patients (Waldek et Feriozzi, 2014; Arends M. *et al.*, 2015). Au Canada, cette thérapie est utilisée selon les lignes directrices développées par la "*Canadian Fabry Disease Initiative*" (CFDI, 2018). Ce groupe met à jour annuellement les critères d'initiation de la thérapie selon les avancements scientifiques et les manifestations cliniques. Un trouble rénal occasionné par la maladie est l'un des critères majeurs qui permet l'initiation de la thérapie chez les hommes en se servant du DFG ou d'une sévère protéinurie.

Bien que les mesures du DFG et de la protéinurie soient utilisées pour évaluer les dommages chroniques au niveau des reins (tel qu'expliqué à la section 1.2), il arrive que ces signes se présentent tardivement ou soient absents (Fall *et al.*, 2016). Considérant ces points, certains chercheurs ont proposé d'évaluer la sévérité de la podocyturie comme moyen alternatif pour démontrer que le patient souffre de troubles rénaux progressifs. À plusieurs reprises, des études ont démontré que la podocyturie pouvait se présenter de manière évidente et précoce chez des patients atteints de la maladie de Fabry avec une néphropathie. Trimarchi *et al.* ont répertorié un jeune patient de 18 ans atteint de la maladie de Fabry qui avait un DFG normal, sans protéinurie, mais qui présentait une quantité de podocytes urinaires (évalués par comptage cellulaire) huit fois plus élevée comparativement à cinq contrôles sains (Trimarchi *et al.*, 2015a). Dans un autre cas, l'équipe de Najafian *et al.* a démontré que les volumes de dépôts glycolipidiques dans les podocytes et l'élargissement de l'espacement entre les podocytes chez les patients Fabry avec une néphropathie corrélaient avec l'âge des patients par microscopie (Najafian *et al.*, 2011). Récemment, une étude de Fall *et al.* a montré par comptage cellulaire que l'augmentation des podocytes urinaires chez des patients atteints de la maladie de Fabry corrélait avec la sévérité clinique de la maladie et pouvait être présente malgré l'absence de protéinurie ou de réduction du DFG (Fall *et al.*, 2016). Finalement, il a

aussi été démontré qu'il était possible d'évaluer l'effet de la TER et de la thérapie par chaperons sur les cellules rénales en évaluant la morphologie des podocytes ancrés ou en mesurant la podocyturie (Trimarchi *et al.*, 2016; Mauer *et al.*, 2017).

Malgré les retombées importantes du point de vue clinique d'évaluer la podocyturie pour permettre d'initier le traitement des patients ou pour assurer leur monitoring, les méthodes existantes sont basées sur des observations relatives et sont parfois non fiables. Par exemple, la mesure du volume de dépôts glycolipidiques dans les podocytes démontre une altération podocytaire chez le patient atteint de la maladie de Fabry et est recommandée au niveau international (Ortiz *et al.*, 2018). Toutefois, ces dépôts ne se présentent pas dans toutes les cellules et peuvent nécessiter une expertise pour interpréter les résultats (CFDI, 2018). Il est donc important de développer de nouvelles stratégies d'analyses pour permettre l'évaluation de la podocyturie chez les patients atteints de la maladie de Fabry de façon simple et fiable.

1.6 Présentation du projet

1.6.1 Problématiques et hypothèses

Tel que discuté précédemment, les outils d'évaluation des dommages rénaux existent, mais peuvent se révéler tardivement et causer un retard important dans la prise en charge du patient. De nouveaux paramètres de dommages rénaux sont recherchés afin d'offrir un moyen alternatif pour diagnostiquer les patients asymptomatiques. Il a été découvert que la podocyturie pouvait s'avérer être un signe hâtif de défaillance rénale, puisque la présence des podocytes serait un signe précoce de la réduction du DFG et de la protéinurie. En évaluant la podocyturie, il y aurait un potentiel pour diagnostiquer plus rapidement les dommages rénaux chez les patients atteints de la prééclampsie, ainsi que les patients atteints de la maladie de Fabry (Tranquilli *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2018). Plusieurs méthodes analytiques permettant l'évaluation de la podocyturie ont été développées et basées sur des principes d'immunofluorescence et d'amplification ARNms spécifiques aux podocytes. Toutefois, ces méthodes sont limitées par leur variabilité, leur complexité technique et leur durée (Trimarchi H., 2017). D'autres méthodes ont aussi été développées pour analyser des protéines podocytaires en utilisant la spectrométrie de masse. Toutefois, elles ne semblaient pas être adaptées pour analyser des urines avec une quantité élevée d'albumine humaine. De plus, les

stratégies analytiques n'étaient pas optimales et étaient à risque de mener à une sous-évaluation de la concentration réelle de protéines podocytaires urinaires à cause du standard utilisé (Shuford *et al.*, 2017).

Devant les limitations mentionnées antérieurement pour évaluer les dommages rénaux et le potentiel d'évaluer la podocyturie par spectrométrie de masse, l'hypothèse de recherche est la suivante: est-ce possible d'évaluer les dommages rénaux, à partir de la podocyturie, à l'aide d'une méthode robuste et efficace basée sur la spectrométrie de masse?

1.6.2 Objectifs

L'objectif principal du projet consistait à développer et à valider une méthode d'analyse quantitative simultanée de la podocalyxine et de la podocine par spectrométrie de masse en tandem en utilisant des standards peptidiques clivables pour évaluer la podocyturie. Les objectifs secondaires consistaient à: 1) doser la podocine et la podocalyxine dans une large cohorte incluant des patients atteints de la maladie de Fabry, de la prééclampsie, ainsi que des contrôles pathologiques et sains; 2) évaluer le potentiel des deux protéines comme biomarqueurs de la podocyturie; et 3) évaluer les corrélations des deux protéines avec d'autres manifestations cliniques.

1.6.3 Perspectives du projet

Concrètement, le développement d'une méthode par spectrométrie de masse efficace et rapide permettant l'évaluation de la podocyturie pourrait offrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la recherche et de la clinique. Au niveau de la recherche, cette méthode analytique pourrait être appliquée pour évaluer la podocyturie dans d'autres maladies rénales glomérulaires ou non glomérulaires. D'autre part, il pourrait être intéressant de combiner les différents outils permettant l'évaluation des problèmes rénaux au sein d'un même projet et de comparer les résultats avec ceux de la méthode développée. De cette façon, il pourrait être possible d'établir des corrélations entre le nombre de podocytes, la quantité d'ARNm et la quantité de protéines podocytaires dans l'urine. Aussi, une étude longitudinale d'une large cohorte de patients et de contrôles pourrait être effectuée pour évaluer l'évolution de la concentration des protéines podocytaires dans le temps. Suite à l'avancée des connaissances et de la technologie, il pourrait être intéressant d'intégrer d'autres protéines podocytaires à la

méthode développée pour étudier ces dernières chez une grande cohorte de patients et évaluer si le profil varie d'un patient à l'autre. Ultimement, il pourrait aussi être possible d'adapter la méthode en utilisant de l'urine prélevée sur papier filtre en vue d'un dépistage à haut-risque des problèmes rénaux.

1.7 Spectrométrie de masse

1.7.1 Historique

Depuis des décennies, les scientifiques ne cessent de développer de nouvelles technologies qui permettent d'effectuer des analyses cliniques plus précises, simples et rapides. La spectrométrie de masse (MS) est une technologie analytique riche en histoire et parmi les outils les plus robustes pour l'analyse, entre autres, des protéines au niveau structural et quantitatif dans les matrices biologiques complexes (Cravatt *et al.*, 2007). Le principe du rapport masse-sur-charge (m/z) des ions a été découvert en 1897 par Sir Joseph John Thomson et son assistant grâce au premier appareil qu'ils ont conçu et qui permettait la déflexion magnétique des rayons cathodiques et l'analyse m/z des électrons. En 1919, Francis William Aston, l'étudiant de Thomson, a construit le premier spectromètre de masse complètement fonctionnel (avec l'aide de Thomson) avec lequel il a identifié plusieurs isotopes naturels. Ces avancées ont contribué au développement de l'analyse par un spectromètre de masse en temps de vol (1946), l'analyse par quadripôles (1953), le chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS) (1967) et l'électronébulisation de macromolécules/micromolécules (1984) (Griffiths J., 2008).

1.7.2 Principes de la spectrométrie de masse

1.7.2.1 Définition

La spectrométrie de masse est une technique qui permet la quantification et/ou l'élucidation de la structure moléculaire d'un composé recherché à partir d'ions spécifiques en phase gazeuse provenant de molécules d'intérêt. Les ions sont des particules chargées qui, lorsque soumises à un champ magnétique ou électrique, peuvent être manipulées dans un espace. Le principe de sélection et d'analyse d'un ion est basé selon son rapport de masse nominale (m) en masse atomique (Da) divisée par le nombre de charges (z) qu'il possède, soit le rapport m/z (Hoffmann et Stroobant, 2007).

1.7.2.2 Fonctionnement général d'un spectromètre de masse

L'analyse par spectrométrie de masse offre de multiples possibilités, considérant les stratégies d'ionisation variées et l'utilisation de différents analyseurs de masse. La Figure 8 montre la coupe schématique d'un spectromètre de masse lors d'une analyse.

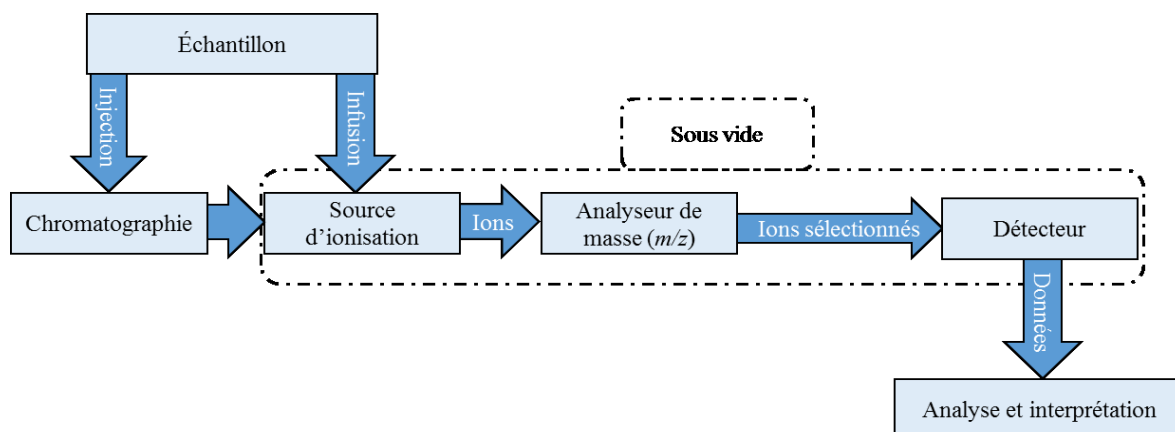


Figure 8. Coupe schématique d'un spectromètre de masse.

Tout d'abord, il est important de préparer l'échantillon, puisqu'il existe des composés dans la matrice comme l'urine ou le sang qui peuvent interférer au niveau de la détection des molécules d'intérêt. Une stratégie couramment utilisée est de coupler la chromatographie liquide à l'instrument pour réduire des interférents qui pourraient éluer avec les molécules étudiées. Par ailleurs, si un échantillon ou un standard est pur ou sans interférent, il est possible de l'infuser directement dans le spectromètre de masse. Une source permettant d'ioniser les molécules se retrouve à l'entrée du spectromètre de masse. Selon le type d'ionisation utilisé, il est possible de créer des ions positifs ou négatifs. Pour conserver un maximum d'ions intacts lors du processus, l'appareil est maintenu sous vide à l'aide de pompes turbomoléculaires pour permettre le retrait des radicaux et des molécules neutres dans l'appareil et éviter une perte de signal par leur collision avec les ions d'intérêt. Suite à l'ionisation, des ions spécifiques correspondant aux molécules d'intérêt seront sélectionnés selon leur rapport m/z à l'aide d'un analyseur de masse. Il est possible d'augmenter la spécificité de l'analyse en combinant deux analyseurs de masse séparés par une chambre à collisions. Cette stratégie en tandem permet de fragmenter l'ion précurseur de la molécule d'intérêt et de sélectionner un ou plusieurs fragments d'ions produits dans la chambre à

collisions. Finalement, les ions sélectionnés seront dirigés vers le détecteur et le signal enregistré sera traité par un logiciel informatique (Hoffmann et Stroobant, 2007).

1.7.2.3 Chromatographie liquide en phase inverse

Chacun des spectromètres de masse utilisés dans le cadre de ce projet était couplé à un système de chromatographie liquide en phase inverse ou non polaire. Cet outil permet la purification rapide et précise des peptides tout en les séparant des autres molécules pouvant interférer grâce à leurs propriétés hydrophobiques. À l'aide d'une phase mobile initialement très aqueuse (hydrophile), une quantité d'interférents polaires et non hydrophobes seront éliminés, puisque l'affinité des peptides avec la colonne sera plus élevée qu'avec la phase mobile et assurera ainsi leur maintien sur la colonne. Par la suite, en augmentant graduellement le pourcentage de phase organique (hydrophobe) de la phase mobile, les peptides seront élués selon leurs propriétés hydrophobes et pourront être séparés. Cette propriété hydrophobe dépendra de la quantité d'acides aminés hydrophobes du peptide. Les résultats peuvent être visualisés par un chromatogramme où l'axe y représente la hauteur du pic, l'aire du pic intégré ou la concentration du pic et l'axe x représente le temps de rétention de la molécule sur la colonne (Büyükköroglu *et al.*, 2018).

Dans le cadre de ce projet, la chromatographie en phase liquide ultra performante (Acquity UPLC H-Class pour le Synapt G1 et Acquity UPLC I-Class pour le Xevo TQ-S, Waters Corp.) a été utilisée. Il est à noter que les chromatographes liquides en ultra performance (UPLC) peuvent subir une pression allant jusqu'à 18 000 psi et utiliser des colonnes de chromatographie ayant des particules inférieures à 2 μm . Ces avantages opérationnels permettent une réduction significative du temps d'analyse d'un échantillon et du volume de phase mobile utilisé comparativement à la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et ce, sans compromettre la qualité de l'analyse. Les appareils utilisés sont munis d'un gestionnaire de colonnes de chromatographie, d'un injecteur automatique, d'une boucle d'injection fixe ayant une capacité de 10 μL (ou plus) et d'un système de pompes binaires permettant l'utilisation d'un gradient linéaire en utilisant deux phases mobiles différentes. Lors du développement d'une méthode analytique, il est important d'évaluer plusieurs types de colonnes de chromatographie en phase inverse, puisque chaque colonne a une phase stationnaire avec des propriétés différentes (Gumustas *et al.*, 2013; Waters, 2019).

La Figure 9 montre l'impact de l'essai de deux colonnes de chromatographie pour cette étude. Dans ce cas, les deux peptides sont mieux retenus, ont une meilleure résolution et un signal plus important sur la colonne CORTECS T3 (Waters) comparativement à d'autres colonnes C18 ayant des propriétés différentes.

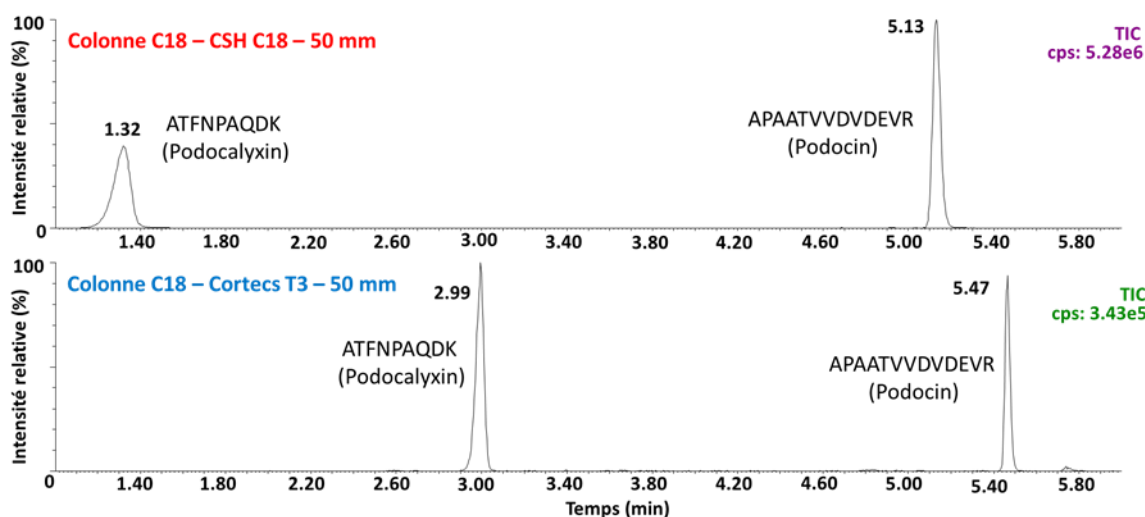


Figure 9. Impact sur les peptides selon le type de colonne utilisée en chromatographie.

En fait, la CORTECS T3 a permis de réduire l'impact des interférents sur les molécules d'intérêt et d'éliminer celui qui éluait avec l'une des molécules ayant le même rapport m/z . D'autres paramètres ont été développés et optimisés, tels que la température d'utilisation de la colonne et sa longueur, de même que le choix des phases mobiles à utiliser lors du gradient linéaire. L'élaboration de ces paramètres ont permis d'ajuster le temps de rétention des molécules sur la colonne de chromatographie, ainsi qu'améliorer la résolution de celle-ci lors de l'acquisition des données. Les paramètres finals sont présentés dans l'article scientifique de *Clinica Chimica Acta* ci-joint.

1.7.2.4 Électronébulisation

L'ionisation des molécules d'intérêt est nécessaire et cruciale en spectrométrie de masse. Bien qu'il existe plusieurs types d'ionisation, l'électronébulisation positive (ESI +) a été utilisée dans le cadre de ce projet et l'ensemble du processus est résumé à la Figure 10.

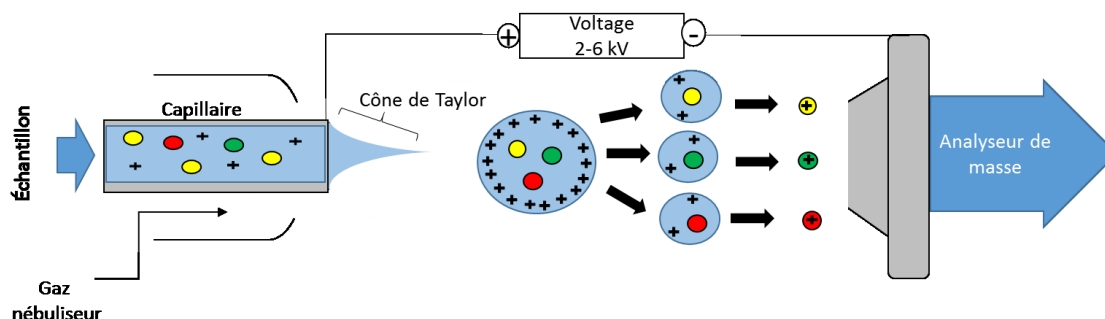


Figure 10. Coupe schématique de l'électronebulisation positive (ESI+).

Cette stratégie permet d'ioniser positivement les molécules d'intérêt à partir d'un processus de formation de fines gouttelettes chargées. Cette ionisation est considérée comme douce puisque l'énergie transmise aux molécules est faible et permet de minimiser la fragmentation des ions durant cette étape. De plus, elle peut permettre l'ionisation d'un large éventail de composés et créer des ions multichargés (El-Aneed *et al.*, 2009). Voici un bref résumé du processus: tout d'abord, les molécules injectées sont acheminées vers un capillaire fin en acier inoxydable ayant une différence de voltage élevée entre sa pointe (l'anode) et l'entrée de l'appareil (la cathode). Combiné avec la fine pointe du capillaire et le gaz de nébulisation, l'échantillon sera dispersé en fines gouttelettes hautement chargées (Kearle, 2000). Ce phénomène est possible grâce au principe du cône de Taylor qui est expliqué par l'équation suivante:

$$E_o = \left(\frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_o r_c} \right)^{\frac{1}{2}}$$

où E_o est le champ électrique, γ est la tension de surface du liquide, r_c est le rayon du capillaire et ϵ_o la permittivité du vide.

Considérant la température élevée dans la chambre à ionisation, le solvant entourant les gouttelettes s'évaporerait, ce qui causerait le rapprochement des charges positives dans les gouttelettes. Ce rapprochement augmenterait la densité des charges, causerait une fission des gouttelettes à cause des répulsions coulombiennes et créerait de plus petites gouttelettes qui deviendraient les ions chargés des molécules après une évaporation complète du solvant. Les ions positifs produits seront dirigés vers l'analyseur de masse grâce à la différence de voltage dans l'appareil et pourront être analysés (Banerjee et Mazumber, 2012).

1.7.2.5 Spectrométrie de masse triple quadripolaire (en tandem)

Un analyseur de masse fréquemment utilisé est l'analyseur de masse quadripolaire. Reconnu pour sa grande sensibilité et accessibilité, l'analyseur quadripolaire permet de créer un filtre ionique permettant de sélectionner les ions d'intérêt à l'aide de quatre électrodes parallèles lorsqu'ils sont sous tension (Figure 11).

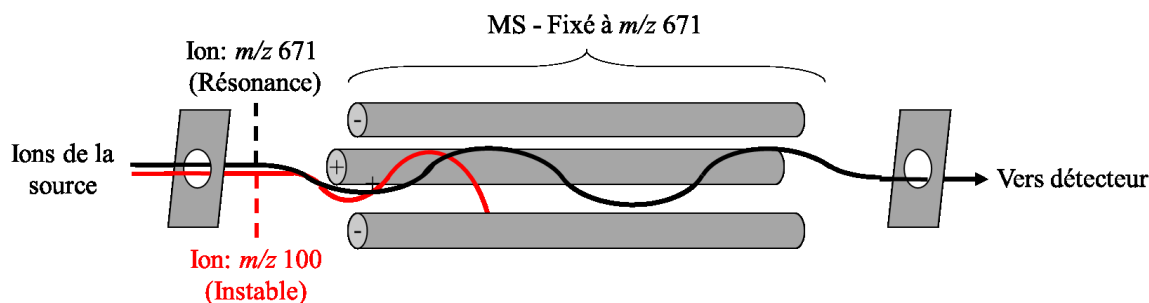


Figure 11. Principe de sélection des ions selon leur rapport m/z .

En bref, grâce à une alternance de polarité entre les tiges à une radiofréquence sélectionnée, un champ électrique oscillant sera créé et permettra de sélectionner les ions d'intérêt selon leur rapport m/z . L'ensemble des ions ayant suivi cette trajectoire seront détectés et interprétés dans un chromatogramme ou un spectre de masse. Cet analyseur a une capacité d'analyser les masses inférieures à 4000 Da.

Afin d'assurer une plus grande sélectivité lors des analyses, il est possible d'avoir recours à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Cette variante instrumentale combine deux quadripôles en tandem séparés par une chambre à collisions. Bien qu'il existe plusieurs stratégies avec cette variante, l'analyse des ions selon la méthode développée dans ce projet a été effectuée par monitoring de réaction simple (SRM) et par monitoring de réactions multiples (MRM). En résumé (Figure 12), le SRM consiste à sélectionner un ion précurseur, soit l'ion représentant la molécule d'intérêt à l'entrée du quadripôle, avec le premier quadripôle. Cet ion est dirigé vers une cellule à collisions où il sera fragmenté à l'aide d'un gaz, soit l'argon, pour produire des ions fragments caractéristiques de l'ion précurseur. À l'aide du deuxième quadripôle, l'un des ions fragments est sélectionné selon son rapport m/z et détecté, tandis que les autres sont évacués par les pompes pour éviter qu'ils puissent interférer avec les molécules d'intérêt (El-Aneed *et al.*, 2009). Le mode MRM est très

similaire à celui du SRM, excepté que le MRM consiste à sélectionner plusieurs ions fragments provenant respectivement d'un ou plusieurs ions précurseurs. Le monitoring de réaction simple ou de réactions multiples permet de réduire le bruit de fond du signal, de diminuer la limite de détection et d'augmenter la sélectivité de la molécule d'intérêt lors de l'analyse.

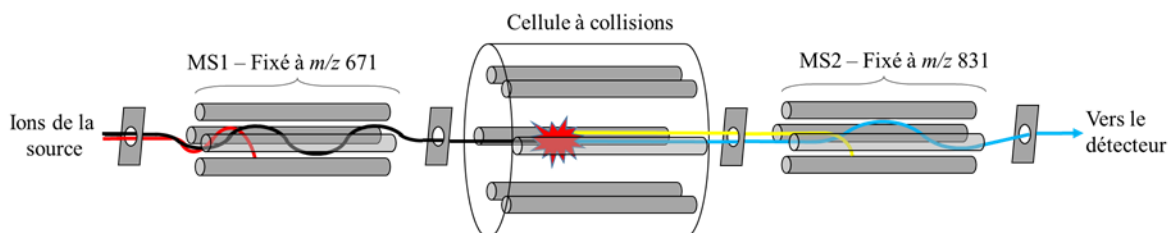


Figure 12. Principe d'analyse d'un ion à l'aide du monitoring de réaction simple (SRM).

Dans le cadre du projet, un spectromètre de masse en tandem Xevo TQ-S (Figure 13) de la compagnie Waters a été utilisé en mode MRM.

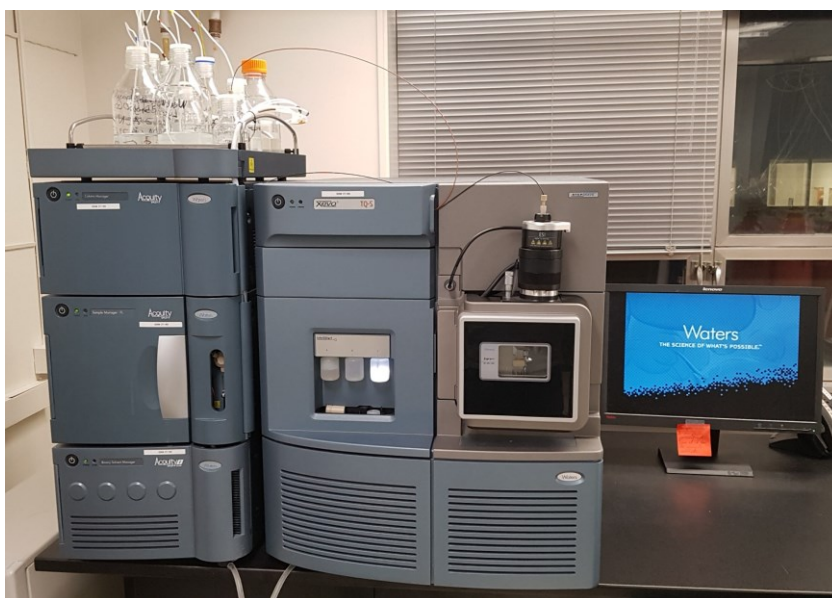


Figure 13. Xevo TQ-S, spectromètre de masse en tandem (à droite) couplé à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance Acuity I-Class (à gauche) (Waters Corp.).

Un avantage important du Xevo TQ-S est que l'appareil a été construit avec un «StepWave», une composante en amont des quadripôles qui favorise le transfert des ions produits vers le premier quadripôle tout en éliminant un maximum de particules neutres pouvant interférer avec les ions d'intérêt (Waters, 2019).

1.7.2.6 Spectrométrie de masse de type temps de vol

Reconnue pour sa grande résolution de masse, la spectrométrie de masse en temps de vol (TOF) est un outil de choix pour l'analyse de molécules. Toutefois, comparativement à un spectromètre de masse quadripolaire en tandem, la sensibilité est moins élevée, ce qui peut limiter le développement de méthodes de quantification de molécules endogènes faiblement abondantes (Petrovic *et al.*, 2006). Au cours de cette étude, cet outil a été utile pour valider les masses exactes des standards utilisés et pour confirmer leurs structures. La stratégie du TOF est basée sur la vitesse des ions détectés dans l'analyseur. Tout d'abord, les ions entrant dans le spectromètre de masse sont initialement accélérés grâce à un champ électrique. La vitesse de ces ions variera selon leur rapport m/z et permettra de les distinguer puisqu'un ion ayant un rapport m/z plus petit sera plus rapide qu'un ion ayant un rapport m/z plus grand. Ce principe est possible grâce à la relation entre l'énergie potentielle et l'énergie cinétique d'une particule chargée. En théorie, les particules chargées dans un champ électrique auront une énergie potentielle définie par l'équation A où E_p est l'énergie potentielle d'une particule chargée, z est la charge de l'ion et U est le potentiel du champ électrique.

Équation A. Énergie potentielle d'une particule chargée

$$E_p = zU \quad (1)$$

Lorsque l'ion chargé est accéléré à l'entrée de l'analyseur de masse, l'énergie potentielle est convertie en énergie cinétique définie par l'équation B où E_k est l'énergie cinétique d'une particule chargée, m est la masse de l'ion et v est la vitesse de l'ion par $\frac{d}{t}$ où d est la distance parcourue et t le temps pour parcourir cette distance.

Équation B. Énergie cinétique d'une particule chargée

$$E_k = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

$$E_k = \frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2 \quad (3)$$

Puisque ces deux principes physiques sont reliés, il est possible de combiner l'équation A et B pour obtenir l'équation C. Selon cette équation, la racine du rapport m/z d'une particule

chargée est proportionnelle au temps de parcours de la particule dans l'analyseur à une constante k .

Équation C. Relation entre l'énergie potentielle et l'énergie cinétique d'une particule chargée (4)

$$E_p = E_k$$

$$zU = \frac{1}{2}m\left(\frac{d}{t}\right)^2 \quad (5)$$



$$t = k\sqrt{\frac{m}{z}} \quad (6)$$

Dans le cadre de ce projet de recherche, un spectromètre de masse développé par la compagnie Waters, soit le Synapt G1, muni d'un quadripôle et d'un analyseur de masse en temps de vol a été utilisé (Figure 14) (Waters, 2019).

Grâce à une cellule à collisions entre les deux analyseurs de masse, il a été possible d'isoler les molécules d'intérêt avec le quadripôle, de les fragmenter avec de l'argon et d'analyser tous les ions fragments pour élucider les structures des molécules à analyser. L'appareil est aussi muni de 2 réflectrons, l'un de type V et l'autre de type W. Un réflectron est un dispositif qui met en œuvre un champ électrique pour permettre aux ions ayant le même rapport m/z , mais avec une énergie cinétique différente, d'atteindre au même moment le détecteur et ainsi de maximiser la résolution de l'instrument. Plus la distance dans le réflecton est grande, plus la résolution sera élevée et moins sera élevée la sensibilité (Boesl, 2017; Water Corp., 2019).



Figure 14. Synapt G1, spectromètre de masse en temps de vol (à droite) couplé à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance Acquity H-Class (à gauche) (Waters Corp.).

1.8 Développement d'une méthode analytique par spectrométrie de masse en tandem

La mise sur pied d'une méthode permettant la quantification de protéines endogènes dans l'urine par spectrométrie de masse est un travail nécessitant l'optimisation de plusieurs étapes essentielles. Pour cette section, le développement de la méthode sera séparé en deux parties: étapes de développement et étapes de validation de la méthode.

1.8.1 Éléments initiaux à considérer

1.8.1.1 Sélection des protéines visées pour la méthode

Avant d'initier un projet lié au dosage de protéines spécifiques, il est important de répertorier les études protéomiques et métaboliques pour déterminer les protéines potentielles à utiliser pour évaluer la podocyture.

Plusieurs protéines associées aux podocytes ont été répertoriées dans la littérature soit la podocine, la podocalyxine, la néphrine et la synaptopodine (Reiser et Altintas, 2016). Grâce à la spectrométrie de masse, il aurait été possible de développer une méthode pour l'analyse simultanée des 4 protéines. Toutefois, il était important d'obtenir une grande quantité de ces protéines pour pouvoir développer et optimiser les étapes clés de la méthode. Nous avons tenté d'analyser une urine de patiente souffrant de la prééclampsie contenant plusieurs

podocytes, mais malheureusement, aucune protéine podocytaire n'a pu être détectée, puisque les étapes du protocole analytique n'étaient pas optimisées. Une autre approche consistait à produire ou à acheter les protéines sous forme de protéines recombinantes en quantité suffisante. Bien que l'idée de synthétiser les protéines était intéressante, la production de protéines recombinantes membranaires eucaryotes à partir de bactéries, de levures ou d'autres cellules nécessitait une grande expertise technique, du temps et des coûts trop élevés pour ce projet de maîtrise (Yuan et Yan, 2014). Par contre, la séquence humaine complète de l'isoforme 1 de la podocine et de l'isoforme 2 de la podocalyxine étaient disponibles commercialement. Tenant compte de ces raisons, seulement la podocine et la podocalyxine ont été analysées pour ce projet, malgré un potentiel analytique éventuel de la néphrine et la synaptopodine.

1.8.1.2 Stratégie analytique des protéines et sélection des transitions MRM

Il existe deux principales approches complémentaires permettant l'analyse des protéines en spectrométrie de masse: 1) descendante (*Top down*) et 2) ascendante (*Bottom up*). L'approche descendante consiste à analyser les protéines directement par spectrométrie de masse, tandis que l'approche ascendante consiste à effectuer une digestion enzymatique de la protéine d'intérêt et d'analyser les peptides produits. L'approche descendante est une stratégie rapide permettant l'analyse de la structure protéique avec un recouvrement de 100% de la séquence. Par contre, le signal obtenu des protéines analysées peut être grandement affecté puisqu'il est souvent diffus par la production de plusieurs ions multichargés pour une même séquence protéique durant l'ionisation. À l'opposé, les peptides produits lors d'une approche ascendante sont plus sensibles au niveau du spectromètre de masse pour une même concentration protéique, puisqu'il est possible de contrôler cet effet avec la digestion enzymatique (Chalmers *et al.*, 2005; Toshimistsu, 2008). Nous avons donc utilisé cette dernière approche qui est aussi souvent utilisée pour quantifier les protéines endogènes, puisque les peptides produits sont équimolaires à leur séquence protéique native. Il existe plusieurs enzymes permettant d'effectuer le clivage des liens peptidiques (Zhang *et al.*, 2014). Quelques exemples sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Exemples d'enzymes utilisées pour la protéolyse des protéines

Endopeptidases	Code enzymatique	Site de clivage
Trypsine	3.4.21.4	Hydrolyse les liaisons peptidiques situées en C-Terminal des résidus de la lysine (K) et l'arginine (R), sauf si elles sont suivies d'une proline (P)
Lys-C	3.4.21.50	Lysine (K) en C-terminal
Asp-N	3.4.24.33	Acide aspartique (D) en N-terminal
Arg-C	3.4.22.8	Arginine (R) en C-Terminal
Glu-C	3.4.21.19	Acide glutamique (E) et légèrement au niveau de l'acide aspartique (D) en C-Terminal
Chymotrypsine	3.4.21.1	Tryptophane (W), phénylalanine (F), Tyrosine (Y) en C-terminal

La trypsine (E.C 3.4.21.4) a été l'enzyme sélectionnée pour ce projet. C'est une endopeptidase qui hydrolyse les liens peptidiques situés en C-Terminal des résidus basiques (lysine (K); arginine (R)) des protéines, excepté lorsqu'ils sont précédés par une proline (P) en N-Terminal. En milieu acide, les peptides produits par cette enzyme sont souvent doublement chargés lors de l'ionisation à cause des charges sur l'amine à l'extrémité N-Terminal du peptide et sur le résidu basique de la lysine ou l'arginine en C-Terminal (Olsen *et al.*, 2004). Il est aussi possible d'avoir une charge nette plus élevée s'il y a d'autres groupes basiques retrouvés dans la séquence (Vandermarliere *et al.*, 2013). La Figure 15 schématise l'activité protéolytique de la trypsine.

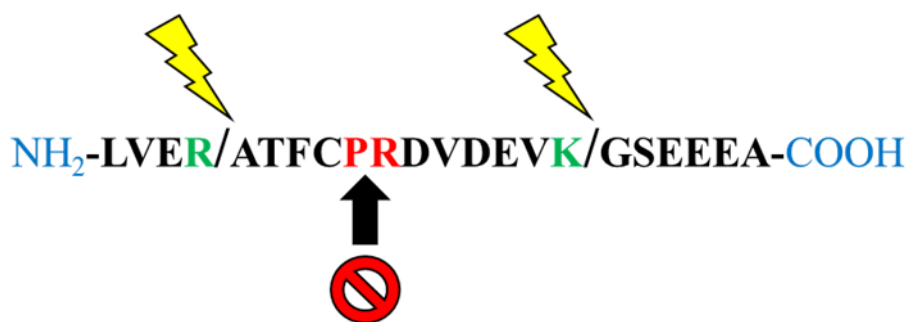


Figure 15. Schéma des sites de clivage de la trypsine sur un polypeptide.

Un autre paramètre à évaluer est le choix du peptide pour la quantification protéique. En fait, certaines séquences peptides peuvent inhiber la digestion enzymatique, être instables ou être difficilement ionisables. De plus, des acides aminés peuvent subir des modifications lors de

la préparation des échantillons pouvant causer de la variation comme une méthionine (oxydation), une cystéine (carbamidométhylation et oxydation), les paires de lysine et arginine (non digérées), une glutamine en N-Terminal (formation d'un acide pyroglutamique), une asparagine (déamination) et les paires acide aspartique-glycine (déamination) (Liebler et Zimmerman, 2013). Suite à ces considérations, l'analyse de l'ensemble des peptides produits des protéines d'intérêt a été effectuée pour sélectionner le peptide optimal. Les séquences peptidiques ont été évaluées selon le signal MS obtenu à partir de leurs ions fragments. Les ions fragments représentent une fraction de la séquence en acides aminés du peptide et sont souvent simplement chargés. À une faible énergie de collision, il est possible d'obtenir majoritairement des ions de types dits b et y qui les représentent. Les ions b sont produits lorsque la charge positive du fragment est à l'extrémité N-terminal du fragment tandis que les ions y sont présents lorsque la charge positive est à l'extrémité du C-terminal. Le numéro de l'ion est attribué en ordre croissant à partir de l'extrémité d'origine (N ou C-Terminal) (Figure 16). Les ions b et y modifient respectivement le m/z d'un acide aminé de 1.008 m/z et 19.018 m/z , ce qui permet de les différencier lors de l'évaluation du profil de fragmentation (Holstein *et al.*, 2011; Medzihradszky, 2005).

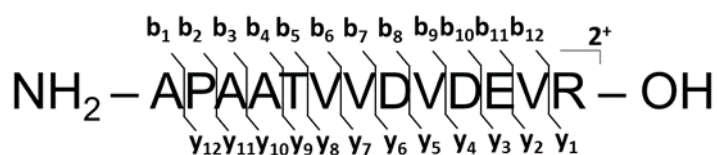


Figure 16. Représentation des ions fragments y et b théoriques sur un peptide.

Dans le cadre de ce projet, une approche ascendante a été utilisée pour faire de la quantification ciblée des protéines podocytaires d'intérêt à partir d'un peptide respectif ayant le signal MS le plus élevé, le plus stable et le plus spécifique. Pour déterminer les peptides appropriés, le profil peptidique de la protéine recombinante de la podocine (Novus Biologicals, Biotechne, Minneapolis, USA) et de la podocalyxine (Creative BioMart, New York, USA) ont été analysés. Les m/z des peptides obtenus ont été étudiés à partir des valeurs théoriques du programme Skyline (Software 4.1, 64-bit, ABSciex, University of Washington,

USA). Les peptides comportant des méthionines et des cystéines ont été exclus, puisqu'ils sont à risque d'avoir des modifications post-traductionnelles. De plus, seulement les peptides de 8 à 25 acides aminés ont été étudiés pour permettre un maximum de sensibilité et de sélectivité en MS/MS. Tel qu'illustré à la Figure 17, il a été déterminé que la séquence peptidique doublement chargée APAATVVDVDEVR (m/z 671.35) de la podocine était la séquence d'acides aminés la plus abondante parmi les séquences détectées. La séquence peptidique doublement chargée ATFNPAQDK (m/z 496.25) a été sélectionnée pour la podocalyxine (voir le résumé dans l'article scientifique de *Clinica Chimica Acta*).

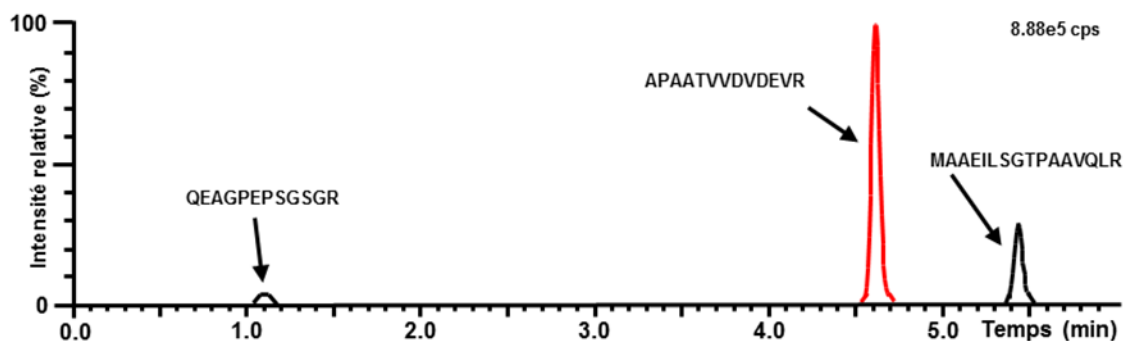


Figure 17. Profil des peptides détectés de la podocine.

Le profil de fragmentation a été effectué pour les deux séquences et les ions simplement chargés y_5 (m/z 558.25) de ATFNPAQDK et l'ion y_7 (m/z 831.42) de APAATVVDVDEVR ont été sélectionnés puisqu'ils étaient plus abondants. La Figure 18 montre un exemple de profil des ions fragments détectés de la séquence ATFNPAQDK pour la podocalyxine confirmée par Q-TOF.

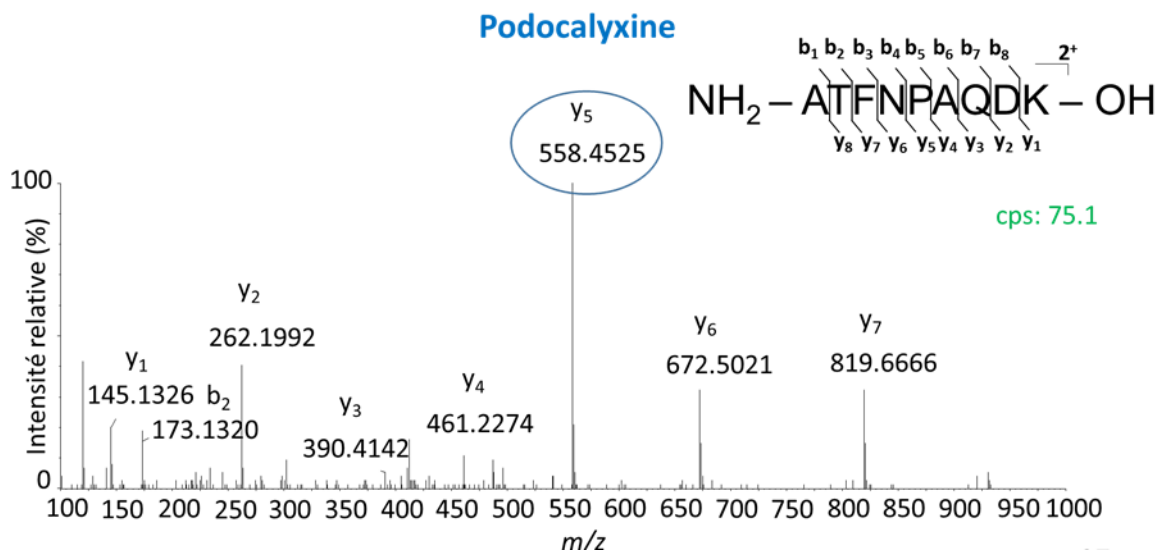


Figure 18. Analyse des ions fragments produits de l'ATFNPAQDK sur le Q-TOF.

La Figure 19 montre un chromatogramme obtenu en utilisant la transition MRM à m/z 496.25 → 558.29 du peptide de la podocalyxine ATFNPAQDK et la transition MRM à m/z 671.25 → 831.42 du peptide de la podocine APAATVVDVDEVR dans le cadre d'une seule injection contenant ces deux molécules à une concentration de 2 nM.

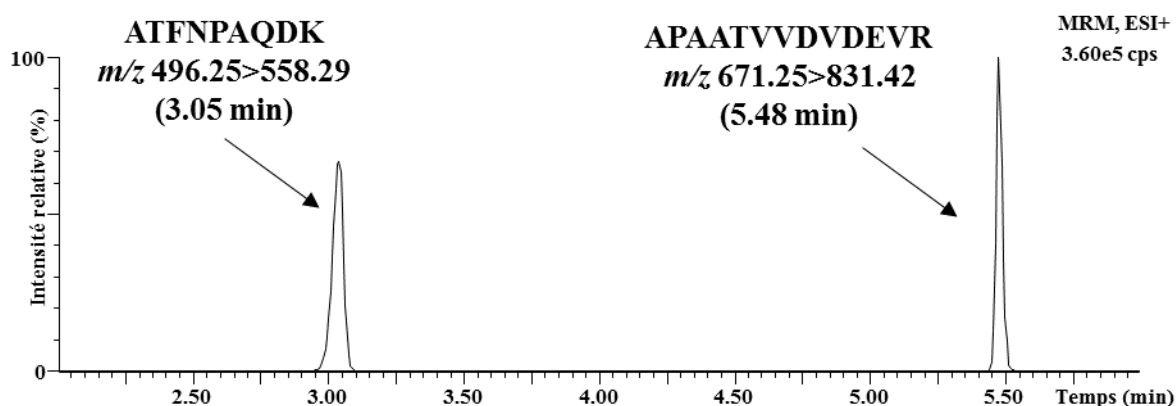


Figure 19. Chromatogramme de l'analyse MRM de ATFNAPQDK et APAATVVDVDEVR. Cps: comptes par seconde.

1.8.1.3 Optimisation de la détection du signal

Une fois les transitions MRM sélectionnées, il est possible d'optimiser les paramètres pouvant affecter le signal détecté à l'aide du système d'infusion et d'injection de l'appareil. En utilisant des standards purs ou des échantillons contenant les peptides d'intérêt digérés,

les paramètres suivants ont été vérifiés et optimisés: le voltage du capillaire, le voltage du cône de la source, le débit et la température du gaz de nébulisation, la température de la chambre à ionisation et l'énergie de collision. L'objectif étant de maximiser la détection des ions, tout en conservant une bonne reproductibilité. Dans le cadre du projet, les peptides APAATVVDVDEVR et ATFNAPAQDK ont été synthétisés par JPT Peptide Technologies (Berlin, Allemagne). La Figure 20 montre un exemple de la stratégie utilisée lors de l'optimisation de l'énergie de collision du peptide de la podocalyxine et de la podocine. Le but consistait à mesurer le signal obtenu, à une même concentration et à cibler l'énergie de la collision offrant le meilleur signal. Les autres paramètres de la méthode ont aussi été vérifiés avec cette même approche.

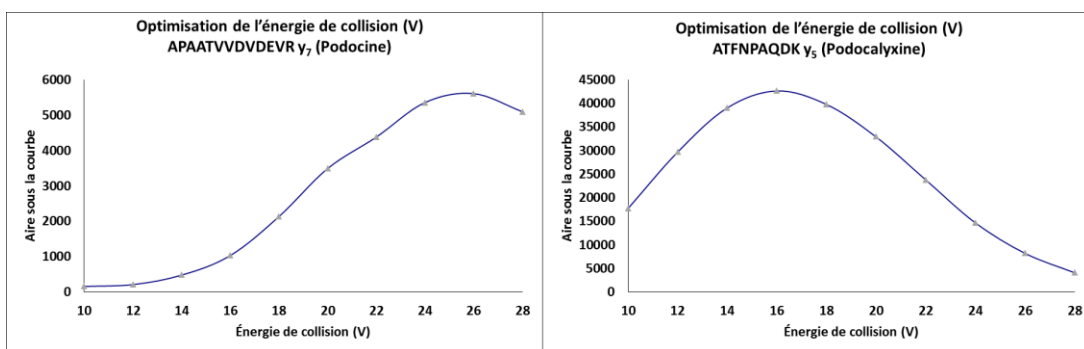


Figure 20. Optimisation de l'énergie de collision pour les peptides analysés.

1.8.1.4 Choix de la matrice: le culot ou le surnageant pour l'analyse des protéines urinaires

L'urine est une matrice biologique facilement accessible contenant les éléments excrétés par l'organisme, ce qui permet de détecter rapidement des anomalies métaboliques et ce, de manière non invasive. Toutefois, la préparation de l'urine est cruciale pour développer une méthode analytique fiable et robuste. Afin d'effectuer l'analyse des protéines urinaires par spectrométrie de masse, il est fréquent d'utiliser le culot ou le surnageant urinaire obtenu suite à une centrifugation de l'urine. Le culot est principalement utilisé pour analyser les protéines moins solubles retrouvées au niveau des sédiments et des cellules urinaires tandis que le surnageant est souvent utilisé pour analyser les protéines solubles dans l'urine (Yu et Pieper, 2015). Des études ont démontré qu'il était possible d'étudier les protéines

podocytaires par spectrométrie de masse à partir du culot et du surnageant urinaire (Garovic *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2014; Biarc *et al.*, 2015). Dans le cadre de ce projet, le signal endogène des peptides analysés a été mesuré dans le culot et le surnageant urinaire. Le fractionnement urinaire a été obtenu en centrifugeant 45 mL d'une urine contrôle pendant 15 min à 2000 x g. La Figure 21 illustre les résultats obtenus pour le peptide de la podocalyxine. L'aire de la courbe mesurée à partir du culot était de 250 tandis que celle mesurée à partir du surnageant était près de 3 500. En normalisant le signal selon le volume utilisé, le signal obtenu avec le culot était de 5,5 par mL tandis que le signal obtenu à partir du surnageant était de 350 par mL. Aucun signal n'avait été détecté pour le peptide de la podocine lors de ce test préliminaire. Suite à ce résultat, nous avons sélectionné le surnageant urinaire comme matrice à analyser pour le dosage des protéines podocytaires, considérant que la concentration de la podocalyxine était nettement plus importante dans le surnageant.

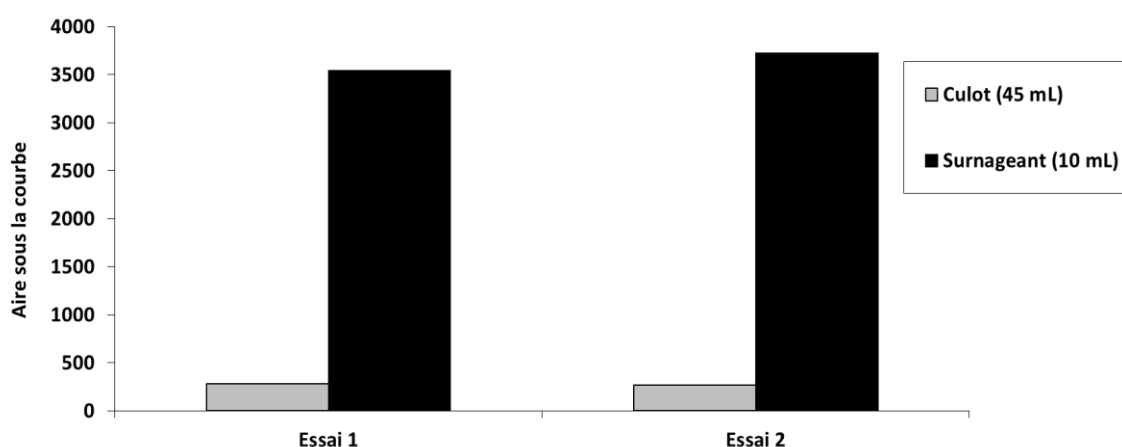


Figure 21. Détection relative de la podocalyxine endogène dans l'urine.

1.8.2 Effet de matrice

L'urine est une matrice biologique de choix pour la découverte de nouveaux biomarqueurs et pour évaluer les changements métaboliques causés par différentes pathologies. Toutefois, elle reste une matrice complexe contenant des déchets métaboliques, de l'urée, des sels inorganiques, de la créatinine, des peptides et plusieurs autres molécules en faible concentration pouvant avoir un impact sur nos analyses. Cet impact est nommé l'effet de matrice. L'effet de matrice est caractérisé par la co-élution de molécules de la matrice pouvant affecter la modulation du signal des molécules d'intérêt et mener à une suppression

ou à une augmentation du signal ionique détecté sur le spectromètre de masse (Matuszewski *et al.*, 2003). Un effet de matrice majeur peut compromettre la précision, l'exactitude et la robustesse d'une méthode quantitative par spectrométrie de masse (Panuwet P. *et al.*, 2016). Plusieurs stratégies peuvent être utilisées durant la préparation de l'échantillon et l'analyse afin d'éliminer, limiter ou corriger cet effet de matrice. Dans le cadre de ce mémoire, nous présenterons seulement les stratégies évaluées ou utilisées.

1.8.2.1 Utilisation d'un standard interne approprié

La complexité de l'urine causée par plusieurs facteurs comme la concentration des protéines excrétées, la diète alimentaire des patients et les sédiments retrouvés dans l'urine peut mener à de la variabilité analytique lors de la préparation et de l'analyse des échantillons (Beasley, 2016).

Une stratégie pour corriger cet effet de matrice est l'ajout d'un standard interne à la préparation avant de débiter l'extraction des échantillons. Le standard interne est une molécule ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que la molécule d'intérêt. Il est ajouté, à une concentration connue, aux échantillons et aux courbes de calibration afin de permettre une quantification des molécules d'intérêt basée sur le rapport entre la molécule endogène d'intérêt et celui-ci. Pour distinguer un peptide endogène et son standard interne, une pratique courante est de modifier la masse du standard interne en remplaçant les éléments atomiques comme le ^{12}C et le ^{14}N par des isotopes stables comme le ^{13}C et le ^{15}N . Un acide aminé composé d'isotopes stables est considéré comme un acide aminé lourd (Berg et Helge, 2011).

Un fait important à prendre en compte durant la quantification protéique est que le standard interne doit corriger chaque étape de préparation de la méthode, incluant la variabilité analytique engendrée par une digestion enzymatique incomplète. Une stratégie consiste à utiliser des standards internes nécessitant une protéolyse pour être détectés. Certes, il est possible de développer des méthodes fiables en utilisant des standards internes ne nécessitant aucune protéolyse (Fu *et al.*, 2015). Par contre, ce type d'approche peut mener à une sous-évaluation de la concentration réelle endogène lorsque la digestion enzymatique est incomplète (Shuford *et al.*, 2017). L'utilisation d'un standard interne telle une protéine

recombinante composée d'isotopes stables au niveau des lysines et arginines serait une solution théoriquement idéale, puisque l'impact de la structure tertiaire de la protéine sur la digestion serait très similaire à celle de la protéine d'intérêt. Toutefois, cette stratégie n'est pas toujours accessible, puisqu'elle est onéreuse et que les standards produits ont une pureté isotopique variable souvent inférieure à 80% (Shuford *et al.*, 2017). Devant ces limitations, une autre stratégie hybride a été proposée dans la littérature. En fait, cela consiste à créer un peptide comportant la séquence d'intérêt avec un allongement d'acides aminés aux extrémités et un acide aminé lourd dans la séquence détectée. Avec cette approche, il est possible d'avoir un standard interne robuste nécessitant une protéolyse à un coût raisonnable et ayant une pureté isotopique de plus de 98%. Par ailleurs, l'allongement des extrémités avec moins de 4 acides aminés et l'absence des autres fragments de la protéine peuvent causer de l'instabilité en ce qui concerne le standard et ne pas représenter totalement les propriétés physico-chimiques de la protéine complète (Scott *et al.*, 2015).

Au cours de ce projet, des standards peptidiques hybrides comportant 5 acides aminés supplémentaires aux extrémités ont été synthétisés par la compagnie JPT Peptide pour assurer une quantification relative des protéines podocytaires endogènes. Les allongements étaient identiques aux séquences protéiques d'intérêt. La décision d'utiliser cette stratégie a été basée sur le coût et le besoin d'utiliser un standard pouvant subir une digestion, puisque les échantillons d'urine analysés avaient des matrices très différentes, ce qui pouvaient grandement affecter la digestion enzymatique. Les versions des standards sans acide aminé lourd ont été utilisées comme étalon pour les courbes de calibration. En ce qui concerne les standards internes, l'arginine de l'APAATVVDVDEVVR et la lysine de l'ATFNPAQDK ont été remplacées par leurs homologues lourds comportant des ^{13}C et des ^{15}N . L'ensemble des séquences utilisées lors du développement de la méthode, ainsi que leurs transitions MRM sont résumées au Tableau 7.

Tableau 7. Résumé des séquences peptidiques synthétisées et leurs transitions MRM.

Séquences peptidiques	Séquences homologues clivables	Transitions MRM (m/z)
ATFNPAQDK	CRAVK/ATFNPAQDK/CGIRL	496.25 > 558.29
ATFNPAQDK*	CRAVK/ATFNPAQDK*/CGIRL	500.25 > 566.29 (+8 Da)
APAATVVDVDEV	PGEPR/APAATVVDVDEV/GSGEE	671.35 > 831.42
APAATVVDVDEV*	PGEPR/APAATVVDVDEV*/GSGEE	676.35 > 841.42 (+10 Da)
*: Acide aminé lourd /: Site de clivage		

La compagnie JPT Peptide a aussi vérifié les séquences peptidiques et garanti l'abondance nette retrouvée dans les vials lors de l'achat. Toutefois, nous avons vérifié la pureté isotopique des standards lourds. La Figure 22 montre un exemple de chromatogramme obtenu lors de la vérification de la pureté isotopique du standard interne de la podocalyxine. Au final, la pureté isotopique pour les deux standards internes était de 98% et confirme que la masse du standard interne est de +10 Da pour celui d'APAATVVDVDEV (arginine lourde ($+^{13}\text{C}_6$ et $+^{15}\text{N}_4$)) et de + 8 Da pour celui d'ATFNPAQDK (lysine lourde ($+^{13}\text{C}_6$, $+^{15}\text{N}_2$)).

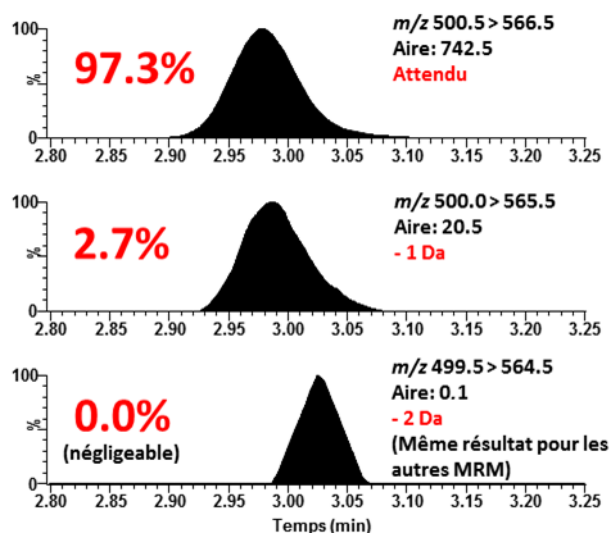


Figure 22. Évaluation de la pureté isotopique du standard interne digéré de la podocalyxine.

1.8.2.2 Déplétion des protéines abondantes interférentes

La présence de protéines abondantes dans les matrices biologiques peut nuire à la détection des protéines à faible concentration qui pourraient agir comme biomarqueur. Ces protéines comme l'albumine peuvent causer un effet de matrice et avoir un impact lors de la préparation et de l'analyse de l'échantillon. Une stratégie utilisée pour réduire ces effets est la déplétion protéique par immunoaffinité. Une étude récente a démontré qu'il a été possible de détecter 2,4 fois plus de protéines dans l'urine déplétée de patients avec de la protéinurie comparativement à la même urine non déplétée (Kushnir M.M *et al.*, 2009)

La déplétion par immunoaffinité consiste à mettre en contact des anticorps spécifiques aux protéines à retirer. L'anticorps va former un ligand avec un site d'acide aminé spécifique et former un complexe qui va piéger la protéine. Les anticorps sont fixés à des billes magnétiques ou à des billes de colonnes d'affinité afin de retirer facilement les anticorps de l'échantillon. La stratégie peut aussi être utilisée pour capturer les protéines d'intérêt en faible concentration et permettre leur enrichissement tout en éliminant l'effet de matrice. Toutefois, ces produits sont fabriqués sur demande et sont plus dispendieux (Whiteaker *et al.*, 2007). Malgré tout, la déplétion des protéines abondantes n'est pas une obligation, puisqu'il a été possible de développer des méthodes pour l'analyse quantitative de protéines sans faire de déplétion (Filip *et al.*, 2015). Dans ce projet, nous avons constaté qu'il y avait un risque que l'albumine sérique humaine puisse interférer lors de notre digestion enzymatique.

Afin de vérifier l'impact de la protéinurie sur la digestion des peptides d'intérêt, une courbe étalon avec seulement de l'albumine sérique humaine à différentes concentrations (0 à 2000 mg/L) a été préparée en y ajoutant 2 nM de peptides clivables de la podocine et la podocalyxine. Ces concentrations ont été établies pour représenter l'étendue des concentrations en albumine retrouvées chez les contrôles et les patients faisant partie de l'étude. La Figure 23 présente l'évolution du signal des peptides clivables selon la concentration de l'albumine sérique humaine dans la matrice. Malgré une légère variation entre 50 et 100 mg/L, nous avons observé que le signal détecté pour les peptides d'intérêt est stable et ce, peu importe la concentration en albumine sérique humaine. La seule différence constatée était que le temps de rétention des molécules d'intérêt lors de la chromatographie

était moins long. Toutefois, le standard interne clivable permettait de corriger cette variable, puisqu'il subissait le même effet. En conclusion, il n'était pas nécessaire de dépler les protéines abondantes retrouvées dans l'urine.

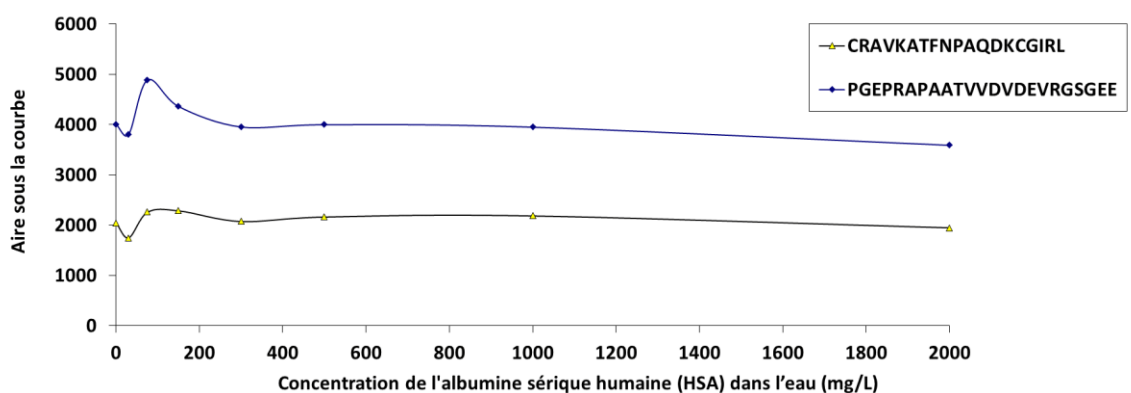


Figure 23. Évaluation de la concentration de l'albumine sérique humaine sur la digestion des standards peptidiques clivables à 2 nM.

1.8.3 Éléments à considérer lors de la digestion enzymatique

La digestion enzymatique est une étape importante qui nécessite une stratégie appropriée dans les bonnes conditions pour réduire les risques d'une digestion incomplète et une quantification erronée des peptides. Dans le cadre de ce projet, la digestion en solution avec la trypsine a été utilisée, puisque cette approche est moins variable et moins complexe que la digestion sur gel. Cette approche consiste à ajouter directement une quantité de trypsine dans l'échantillon (Feist et Hummon, 2015). Plusieurs paramètres ont dû être évalués afin d'assurer une activité enzymatique optimale et reproductible.

1.8.3.1 pH des échantillons

Le potentiel hydrogène (pH) permet de mesurer l'activité chimique des ions d'hydrogène en solution et de déterminer l'acidité ou la basicité d'une solution. Le pH optimal de la trypsine durant la digestion est entre 7.8 et 8.7 (Kassera et Laidler, 1969). Puisque l'urine peut avoir un pH variable, l'activité enzymatique de la trypsine peut grandement être affectée (Cook *et al.*, 2007). Afin d'uniformiser le pH des urines, nous l'avons ajusté à 8 en ajoutant du bicarbonate de sodium à une concentration finale de 50 mM.

1.8.3.2 Linéarisation des protéines

Le repliement des protéines causé par les interactions entre leurs acides aminés peut réduire l'accessibilité de la trypsine aux sites de clivage et mener à la digestion partielle de la protéine (Dill *et al.*, 2008). Une stratégie pour réduire l'impact du repliement des protéines est de linéariser les protéines en les dénaturant ou en modifiant la structure de certains acides aminés. Tout d'abord, il est possible de dénaturer les protéines à l'aide de composés comme le dodécylsulfate de sodium (SDS), l'urée et le déoxycholate de sodium (DOC). (León *et al.*, 2013). Le SDS est un détergent ionique très efficace, mais peut co-éluer avec les molécules d'intérêt et causer de la suppression ionique au niveau du spectromètre de masse (Zhou *et al.*, 2012). L'urée est un agent chaotrope qui n'interfère pas avec l'appareil, mais qui peut contribuer à une carbamylation des acides aminés en N-terminal et mener à une fausse identification protéique (Angel et Orlando, 2007). Le DOC est un surfactant venant de la bile qui peut augmenter l'efficacité de digestion en améliorant la lyse membranaire des cellules. De plus, étant insoluble en milieu acide, il peut être facilement éliminé par centrifugation à pH acide (Lin *et al.*, 2008). Nous avons évalué l'impact de l'utilisation d'un agent dénaturant. La Figure 24 montre la comparaison, en triplicata, de plusieurs agents dénaturants à certaines concentrations (Rapigest™ (Waters), DOC et acétonitrile (ACN)).

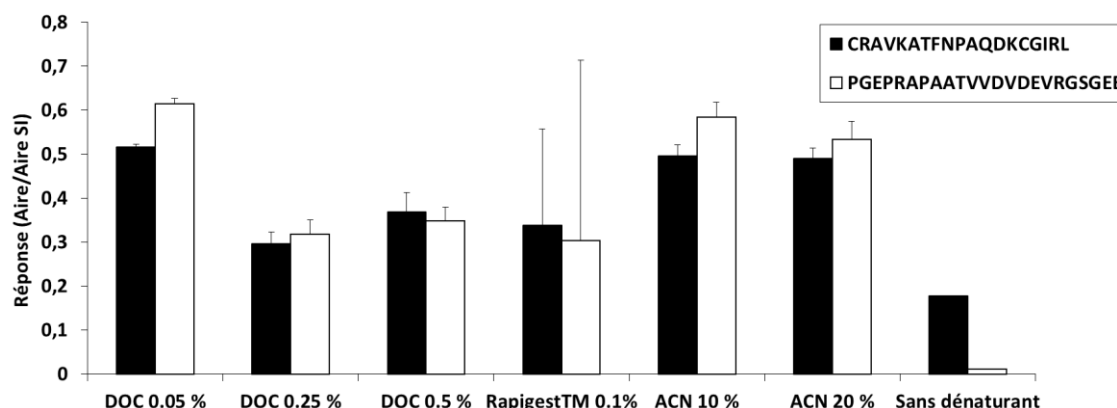


Figure 24. Résumé du signal peptidique obtenu en utilisant différents agents dénaturants lors de la digestion enzymatique.

Il a été constaté qu'il était nécessaire d'ajouter un agent dénaturant pour favoriser la production des deux peptides lors de la digestion enzymatique. Le DOC a été retenu à une

concentration de 0.05 % (m/v), puisqu'il permettait d'obtenir le meilleur signal peptide et d'obtenir des résultats moins variables et ce, sans causer de précipitations dans les échantillons comme avec l'ACN 10% et 20%. De plus, il était facilement éliminé en acidifiant le milieu à 0.5% d'acide formique, suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 14 000 rpm.

Une autre stratégie pouvant être utilisée pour linéariser les protéines, en combinaison avec un agent dénaturant, est la réduction permanente des ponts disulfures. Ces ponts se forment entre deux cystéines au niveau des thiols et peuvent nuire au dépliement de la protéine, même s'il y a un agent dénaturant (Zhang *et al.*, 2010). Afin de réduire ces ponts de manière permanente, il est possible d'effectuer une réduction des ponts disulfures à l'aide du dithiothréitol (DTT), suivi d'une carbamidométhylation avec de l'iodoacétamide. (Gundry *et al.*, 2010). L'iodoacétamide est un agent alkylant qui se lie au groupement thiol des cystéines de manière covalente et empêche la formation des ponts disulfures (Rombouts *et al.*, 2013). Au cours de cette étude, nous avons démontré qu'une réduction, suivie d'une alkylation des ponts disulfures, avait un impact positif sur la digestion. La Figure 25 montre un résumé du signal peptidique obtenu en modifiant les rapports de DTT et d'iodoacétamide lors de la digestion des peptides clivables.

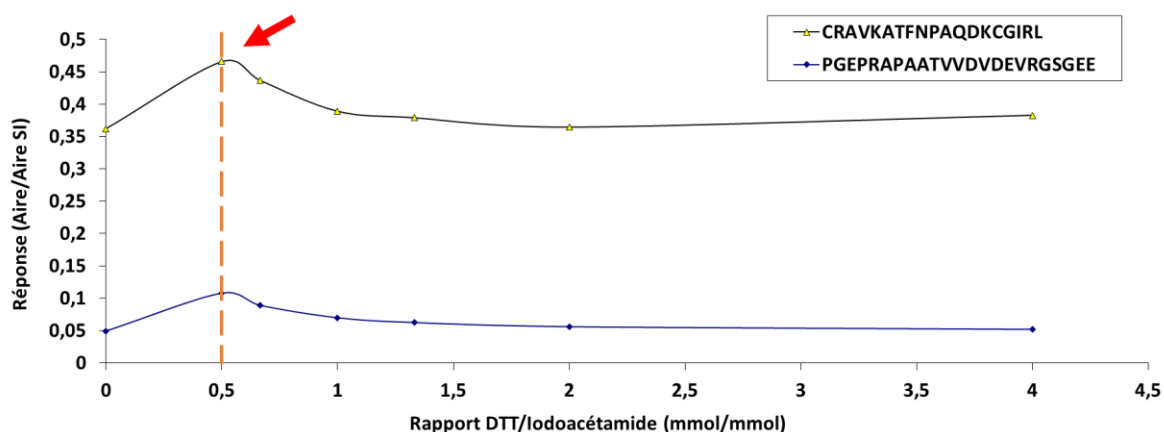


Figure 25. Effet du rapport de dithiothréitol/iodoacétamide lors de la digestion des peptides clivables utilisés pour évaluer la concentration protéique de la podocyture.

Le rapport 0,5 DTT/iodoacétamide permet d'obtenir la réponse la plus élevée. Après plusieurs comparaisons utilisant la même approche, il a été montré qu'une réduction avec 15

mM de DTT (incubée à 60°C pendant 30 minutes), suivie d'une alkylation avec 30 mM d'iodoacétamide (incubée à 22°C, pendant 30 min, à l'abri de la lumière) donnait les résultats les plus optimaux. D'autre part, nous avons vérifié l'effet de la carbamidométhylation dans l'urine et l'eau dans le temps en digérant 50 mM de peptides clivables avec 50 µg de trypsine. Ce test a montré que la carbamidométhylation avait un impact favorable lorsque la matrice était plus complexe comme le montre les résultats en comparant les valeurs qui sont plus élevées dans l'urine ayant subi un traitement au DTT/iodoacétamide plutôt que sans traitement (Figure 26).

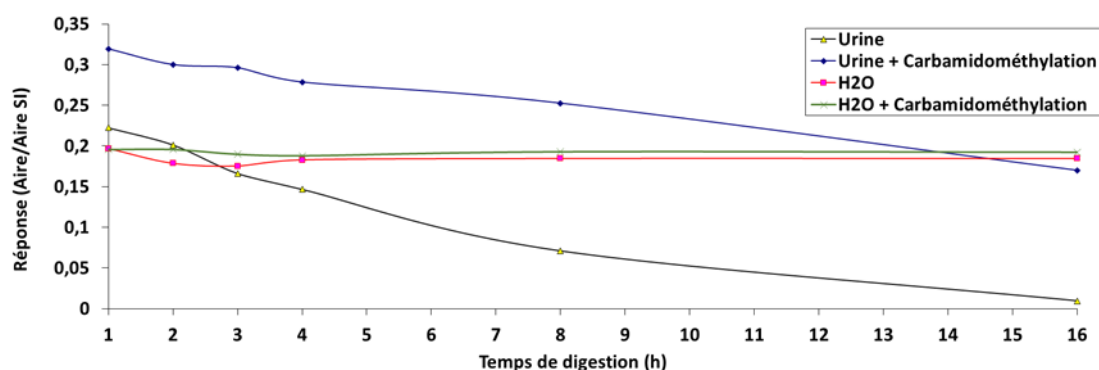


Figure 26. Évaluation de la digestion dans le temps avec et sans carbamidométhylation du CRAVKATFNPAQDKCGIRL.

1.8.3.3 Temps de digestion et concentration de l'enzyme

Il est important de considérer plusieurs autres paramètres de digestion: l'activité catalytique de l'enzyme par la concentration de celle-ci, la température lors de la digestion, le temps de digestion, ainsi que la vitesse de production et de dégradation des peptides. Puisque les protéines ont toutes une unicité qui leur est propre et ce, avec diverses propriétés, et dû au fait qu'il n'existe pas de protocole généralisé pour la digestion enzymatique, il est nécessaire de vérifier les paramètres mentionnés ci-dessus (Proc. *et al.*, 2010).

Lors du test à la Figure 26, nous voulions observer si le temps de la digestion avait un impact sur la réponse sur nos peptides clivables lorsqu'ils étaient dans l'urine et l'eau. Le test illustre les résultats du peptide de la podocalyxine seulement. En digérant 50 mM de peptides clivables avec 50 µg de trypsine, il semblait que la digestion enzymatique était complète après 1 h. Toutefois, nous avons constaté que le peptide clivable du

CRAVATFNPAQDKCGIRL dans l'urine semblait moins stable que dans l'eau. Par conséquent, nous avons établi que la digestion de plus de 4 h réduisait le signal de notre peptide. Nous avons donc évalué l'impact du temps de digestion sur l'albumine sérique humaine à différents rapports trypsine/protéines pour déterminer le temps d'incubation optimal de digestion enzymatique. La raison de ce test était que la quantité d'HSA était nettement plus abondante que celle de la podocine et la podocalyxine. Puisque nous savions que les peptides clivables d'intérêt étaient digérés en moins de 4h, le facteur limitatif pouvant affecter ce temps était la compétition de l'enzyme pour les autres protéines plus abondantes. Pour ce faire, nous avons évalué le temps où l'HSA était la plus digérée, soit entre 1h et 4h de digestion. De plus, nous voulions évaluer si l'utilisation d'un excès de trypsine durant la digestion pouvait avoir un impact négatif ou positif sur la digestion des protéines. En fait, il est commun d'utiliser un rapport molaire de 20:1 à 100:1 (protéine:trypsine), mais aucune règle n'existe officiellement dans la littérature. Afin d'évaluer cet impact, nous avons testé en même temps différents rapports trypsine/HSA et mesuré le signal relatif obtenu du peptide LVNEVTEFAK de l'HSA pour évaluer si un excès de trypsine pouvait nuire à la digestion. Nous avons donc digéré 100, 300, 1000 et 2000 µg/L HSA avec 50 µg de trypsine durant 1 à 4h (soit un rapport molaire protéine:trypsine de près de 1:1, 3:1, 9:1, 18:1) pour représenter l'étendue des concentrations en HSA pouvant être retrouvées dans nos échantillons. Tel qu'illustré à la Figure 27, nous avons observé que le signal obtenu pour les 4 concentrations semble atteindre un plateau à 2h avant de diminuer dans le temps et ce, peu importe le rapport trypsine/albumine.

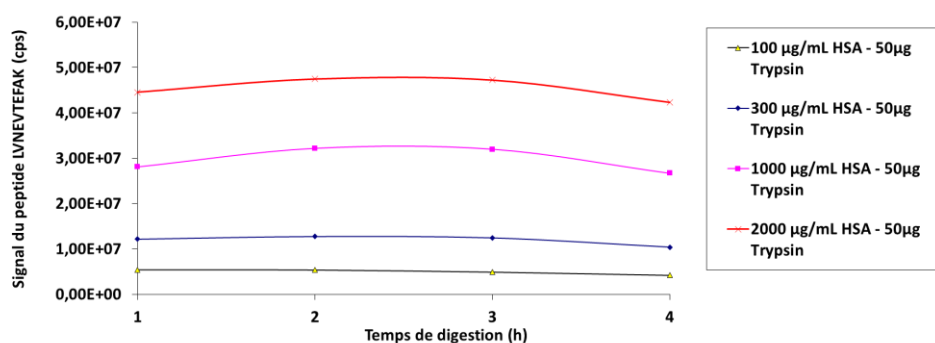


Figure 27. Évaluation de l'efficacité de la digestion dans le temps et selon le rapport molaire trypsine/protéines HSA.

Le signal à 2h était de 5×10^6 cps, 12×10^6 cps, 30×10^6 cps et 48×10^6 cps respectivement pour 100, 300, 1000 et 2000 mg/L HSA. En formant une courbe linéaire avec ces valeurs avec un coefficient de régression (R^2) de 0,986, nous avons conclu qu'en utilisant 50 μ g de trypsine par échantillon, la digestion des protéines serait uniforme peu importe si le rapport molaire protéine:trypsine est de 1:1 à 1:18 (Figure 28). Ainsi, nous avons pu statuer que la digestion enzymatique devait être de 2 h avec 50 μ g de trypsine. Les tests ont été effectués à la température optimale de l'enzyme à 37°C. Nous n'avons constaté aucun gain en augmentant la température durant la digestion enzymatique avec la trypsine.

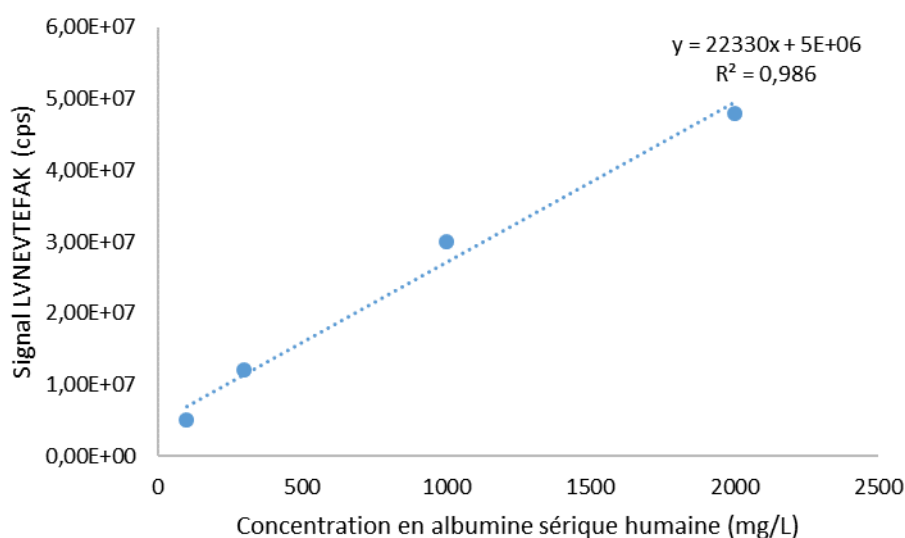


Figure 28. Courbe linéaire de quantification de l'albumine sérique humaine après 2 h de digestion, à 37°C, avec 50 μ g de trypsine.

1.8.4 Éléments à considérer après la digestion

1.8.4.1 Purification et concentration de l'échantillon

Il est parfois nécessaire de purifier l'échantillon digéré pour éliminer un maximum d'interférents pouvant causer de l'effet de matrice sur le MS. Une stratégie utilisée est d'effectuer une extraction en phase solide (Zhou *et al.*, 2017). Le principe consiste à déposer l'échantillon liquide sur une phase stationnaire à base de silice ou de polymères. Cette phase permet la rétention des molécules ayant des affinités avec cette dernière, tandis que les autres molécules seront éliminées. Le procédé se résume en 4 étapes: 1) le conditionnement de la

colonne pour activer les sites de liaison, 2) le dépôt de l'échantillon sur la colonne, 3) les lavages pour éliminer les molécules non adhérentes, et 4) l'élution des molécules adhérentes (Humbert, 2010).

Au cours de ce projet, nous avons utilisé des cartouches d'extraction (OasisTM, 3cc, 60 mg, Waters) composées d'une phase stationnaire mixte contenant un polymère permettant la rétention des composés basiques échangeurs de cations (MCX) comme les peptides. La méthodologie impliquant l'extraction est explicitée dans l'article scientifique *Clinica Chimica Acta* ci-joint. Les étapes ont été développées pour pouvoir obtenir la récupération relative la plus élevée tout en éliminant un maximum d'interférents. La récupération relative a été déterminée en comparant la réponse des peptides extraits à la réponse des peptides lorsqu'ils sont ajoutés après l'extraction à la même concentration (Matuszewski, 2003). La Figure 29 illustre l'optimisation de l'étape d'élution des molécules sur la cartouche en testant différentes combinaisons de solvants. Dans cet exemple, nous avons conclu que la combinaison permettant la récupération des deux peptides au pourcentage le plus élevé était 20% ACN : 80% 100mM formate d'ammonium. L'ensemble des paramètres optimisés sont retrouvés dans l'article scientifique *Clinica Chimica Acta* ci-joint.

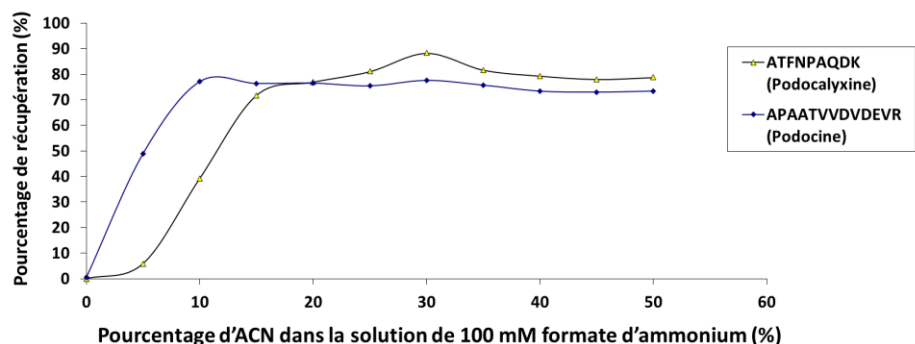


Figure 29. Évaluation du pourcentage de récupération des peptides lors de l'extraction MCX.

1.8.4.2 Concentration des molécules d'intérêt

Le manque de sensibilité des molécules d'intérêt peut être un facteur limitant lors du développement d'une méthode analytique par spectrométrie de masse (Drucker et Krapfenbauer, 2013). Il est donc possible de concentrer les molécules si l'effet de matrice est limité en vue d'augmenter la sensibilité de l'analyse sur le MS. Bien qu'il existe des stratégies d'enrichissement avant le traitement de l'urine, elles ne seront pas mentionnées dans ce mémoire, car elles n'ont pas été utilisées dû au coût rébarbatif.

Durant cette étude, puisque nous obtenions un volume de 1 mL après la purification des échantillons, nous avons une possibilité de concentrer les molécules éluées à un volume inférieur à celui utilisé lors du chargement. Puisque la phase d'élution était composée de 80% de phase aqueuse, une évaporation sous vide a été utilisée pour assurer une évaporation rapide et permettre de concentrer 10 fois les molécules d'intérêt. De plus, nous avons obtenu une récupération relative de 98%. Cette étape nous a permis de détecter la podocine endogène dans les échantillons.

1.9 Validation d'une méthode analytique

Afin de s'assurer que les méthodes développées par spectrométrie de masse sont robustes et reproductibles, il faut effectuer une validation de la méthode. Pour ce faire, il est possible de se référer à plusieurs guides de validation du domaine clinique. Un guide de validation des méthodes bioanalytiques souvent utilisé dans l'industrie pharmaceutique est celui de la "*Food and Drug Administration*" (FDA) (Kadian *et al.*, 2016). Inspirés de ce guide, nous avons établi des paramètres à évaluer pour notre méthode qui seront présentés dans cette section.

1.9.1 Évaluation intra et inter-jour de la précision et l'exactitude des résultats

Il est important de vérifier que les mesures obtenues sont précises et exactes. La précision est la capacité de mesurer la même valeur expérimentale à plusieurs reprises pour un même échantillon tandis que l'exactitude est la capacité de mesurer la véritable concentration dans l'échantillon. Le critère d'acceptabilité pour la précision est d'avoir un coefficient de variation (%RSD) < 15% entre les réplicats mesurés à une même concentration, tandis que celui pour l'exactitude est d'avoir un biais (%) < 15% entre la valeur mesurée et la valeur

attendue. Les équations D et E représentent respectivement l'équation de l'écart-type relatif et le biais.

Équation D. Coefficient de variation (%RSD)

$$\%RSD = \frac{\text{Écart type}}{\text{Moyenne}} * 100$$

Équation E. Biais (%)

$$\%biais = \frac{(\text{Valeur mesurée} - \text{Valeur de référence})}{\text{Valeur de référence}} * 100$$

Ces tests sont vérifiés lors d'une même journée (intrajour) avec 5 réplicats et lors de 5 jours différents (interjours) avec, au minimum, 3 réplicats. De plus, ces tests sont effectués avec des contrôles de qualité (QCs) à différentes concentrations (faiblement à fortement concentrées). En ce qui concerne la précision, nous avons analysé une urine contenant peu de podocine et podocalyxine auxquelles des concentrations de 0.3, 2.5 et 5 nM de peptides clivables ont été ajoutées. L'exactitude a été évaluée en ajoutant les mêmes concentrations à de l'urine humaine synthétique sans trace de protéines podocytaires pour éviter un biais causé par la concentration endogène des protéines podocytaires. Ces concentrations ont été établies pour mieux représenter les différentes valeurs pouvant être obtenues dans les échantillons du projet de recherche (Kadian *et al.*, 2016).

1.9.2 Évaluation de la limite de quantification et de détection

Lors de la validation, il faut évaluer la limite analytique de la méthode en mesurant la limite de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour valider les limites de sensibilité de l'instrument. La LOD et LOQ représentent, respectivement, le signal lorsqu'il est trois fois et dix fois plus élevé que le bruit de fond de l'appareil. La LOD est la plus petite concentration pouvant être détectée sur l'instrument, tandis que la LOQ représente la plus petite concentration pouvant être quantifiée avec une exactitude et une précision plus petite que 20% (Kadian *et al.*, 2016). Les résultats obtenus sont présentés dans l'article *Clinica Chimica Acta* ci-joint.

1.9.3 Évaluation de la courbe de calibration

Afin d'assurer une mesure reproductible basée sur la réponse obtenue, une validation de la courbe de quantification a été effectuée. Selon les critères analytiques, nous devons utiliser une courbe de calibration contenant au moins 6 points de calibration incluant un point près de la limite de quantification (Kadian *et al.*, 2016). Notre critère d'acceptation de la courbe de quantification était que le coefficient de régression de la courbe (R^2) devait être supérieur à 0.995 et que chaque point de la courbe devait avoir un coefficient de variation inférieur à 15% par rapport à la valeur théorique, excepté pour le point à la limite de quantification qui peut avoir un biais égal à 20% et ce, à 5 reprises. Si un point avait un coefficient de variation supérieur à la limite définie, le point était exclu pour ne pas affecter les résultats, tout en cherchant la raison de cette variation élevée pour la corriger. Si le R^2 était inférieur à 0.995, les mesures obtenues étaient considérées comme non valables. La valeur de la concentration maximale de la courbe a été définie pour pouvoir quantifier l'ensemble des échantillons du projet. Une courbe quadratique forcée à l'origine a été utilisée pour pouvoir mesurer les faibles concentrations de la podocine et pour assurer une plus grande robustesse de la méthode de quantification. Des courbes de 9 points variant de 0 nmol/L à 8 nmol/L de peptides clivables de la podocine et de la podocalyxine ont été développées et sont illustrées à la Figure 30.

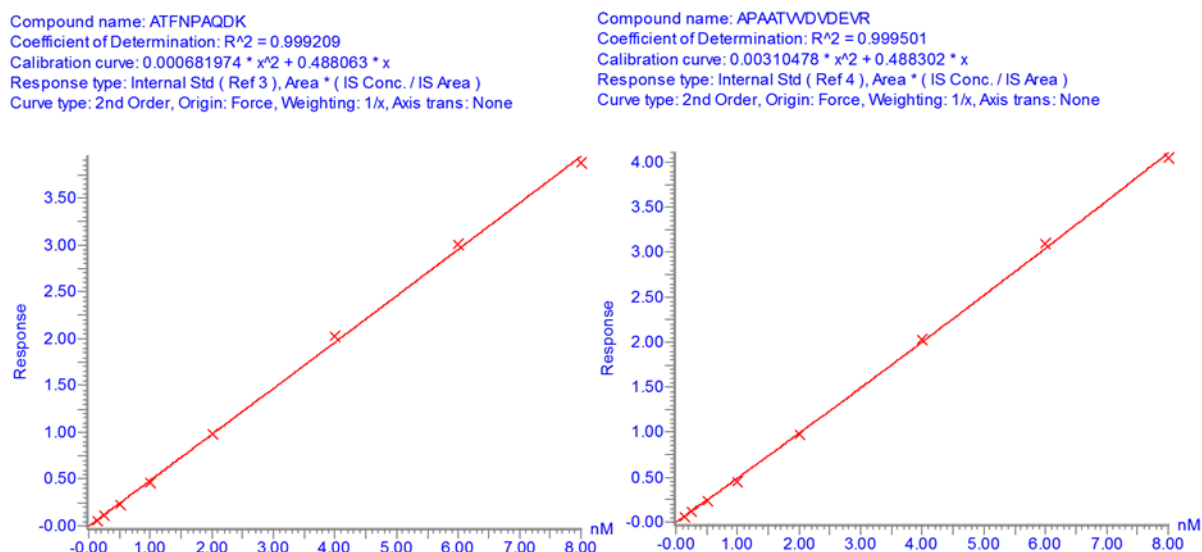


Figure 30. Courbes de calibration de la podocalyxine et de la podocine.

1.9.4 Évaluation de la stabilité des molécules dans l'urine

Selon les critères de validation du FDA, il est nécessaire d'évaluer s'il y a de la dégradation durant la collecte, l'entreposage et l'analyse des molécules des échantillons. Pour ce faire, la dégradation des molécules doit être évaluée à différentes températures, à différentes concentrations et à différents cycles de gel et dégel. Afin de confirmer que les molécules sont stables, le biais des valeurs mesurées (en trois réplicats) doit être plus petit que 15% de la valeur mesurée au temps initial (T=0) (Kadian *et al.*, 2016). À l'aide des QCs à 0,3 (LQC) et 5 (HQC) nM dans l'urine, la stabilité a été évaluée à 23°C, 4°C, -30°C et -80°C sur une durée variant de 24 h à 2 semaines. De plus, la stabilité des molécules a aussi été évaluée une fois les échantillons préparés et conservés dans l'échantillonneur du UPLC à 20°C. La Figure 31 montre les résultats obtenus pour la stabilité de la podocalyxine à faible concentration (LQC) et à haute concentration (HQC). Selon les résultats obtenus, les molécules étaient plus stables à -30°C et à -80°C. Les échantillons préparés et laissés dans l'échantillonneur pendant 48 h ont demeuré stables.

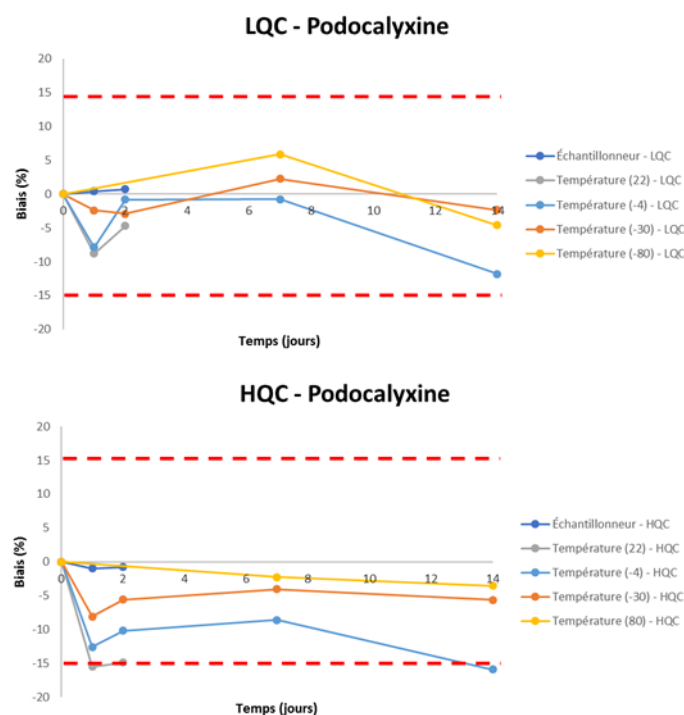


Figure 31. Stabilité de la podocalyxine dans le temps à différentes températures et à différentes concentrations.

D'autre part, la stabilité des molécules selon plusieurs cycles de gel/dégel a aussi été évaluée. Après avoir réalisé 5 cycles, répétés 3 fois en triplicats avec le LQC et le HQC, le biais maximal mesuré était de 5%. Ceci montre que ces cycles de gel/dégel ont peu d'impact sur nos analyses.

1.9.5 Évaluation de l'effet de matrice

Il n'existe pas un critère fixe pour évaluer l'effet de matrice. Toutefois, il est nécessaire d'évaluer son impact, tel qu'expliqué précédemment, puisqu'il peut causer de la variabilité analytique et augmenter la limite de détection. Il faut donc investiguer l'effet de matrice pour s'assurer qu'il est réduit au maximum. Il est possible de l'évaluer en effectuant une infusion post-colonne de chromatographie. Cette approche permet d'évaluer relativement et visuellement l'augmentation ou la suppression du signal de nos molécules. Brièvement, la molécule d'intérêt est infusée directement dans le MS à un débit fixe et à une concentration également fixe pendant que différentes matrices d'intérêt sont injectées dans l'échantillonneur selon la méthode développée. Afin d'évaluer l'effet de matrice, un blanc sans matrice est injecté pour obtenir le signal infusé sans effet de matrice. Par la suite, cette référence est comparée aux différents résultats obtenus avec les différentes matrices. En connaissant le temps de rétention de nos molécules d'intérêt, il est possible d'évaluer l'effet de matrice à ce moment en mesurant le biais entre le signal de référence et le signal obtenu avec de la matrice (Panuwet *et al.*, 2016). Les résultats de ces tests sont présentés dans l'article scientifique *Clinica Chimica Acta* ci-joint. En résumé, les peptides produits provenant du HSA sont les principaux responsables de la suppression du signal mesuré sur le MS. Toutefois, grâce aux différentes étapes de préparation, l'effet de matrice a été limité et le standard interne a permis de corriger adéquatement la réponse pour obtenir des résultats reproductibles.

1.9.6 Évaluation de l'adhésion au plastique

L'évaluation de l'adsorption des molécules sur les tubes en polypropylène utilisés pour ce projet est importante afin de s'assurer que le matériel utilisé ne cause pas de perte durant la préparation (Moein *et al.*, 2017). Nous avons donc évalué la réponse obtenue avec aucun transfert, qui a été comparée avec la réponse obtenue après 5 transferts dans des tubes propres de polypropylène. Tous les tests ont été effectués en triple réplicats avec le LQC et le HQC.

Nos résultats montrent que le biais obtenu était inférieur à 2% pour l'ensemble des concentrations. Si le biais avait été plus élevé, il aurait été primordial d'utiliser un autre type de matériau pour éviter une variabilité analytique (Moein *et al.*, 2017).

1.9.7 Évaluation de la récupération des molécules d'intérêt

Bien que la récupération relative des molécules d'intérêt ait été évaluée à chacune des étapes, la récupération totale de celles-ci a aussi été évaluée lors de la validation. Ce critère permet d'évaluer si le développement de la méthode a permis d'optimiser la récupération des molécules d'intérêt (Moein *et al.*, 2017). Bien que ce critère ne soit qu'à titre informatif, l'objectif est d'évaluer s'il y a une grande perte des molécules tout au long du processus d'analyse. Nous avons aussi pu évaluer ce critère à plusieurs reprises durant le développement de la méthode pour observer l'impact des modifications effectuées. Pour ce faire, la réponse obtenue avec des peptides clivables extraits a été comparée avec la réponse obtenue d'une matrice extraite où la concentration équivalente en peptide non clivable a été ajoutée (référence). Le test a été effectué en cinq réplicats avec les LQC et HQC pour la podocine et podocalyxine. La récupération obtenue pour la podocalyxine variait de 65,2 à 69,8% tandis que celle de la podocine variait de 72,9 à 81,2%. Sachant que la récupération à partir de la purification jusqu'à l'analyse était de 10%, nous avons pu conclure que la plus grande variabilité provenait de l'étape de la digestion. Ce résultat a aussi démontré que le standard interne clivable jouait un rôle majeur lors de l'analyse et permettait une correction importante de la variabilité lors de la digestion enzymatique.

ARTICLE 1

Tandem mass spectrometry analysis of urinary podocalyxin and podocin in the investigation of podocyture in women with preeclampsia and Fabry disease patients

Auteurs de l'article: Tristan Martineau, Michel Boutin, Anne-Marie Côté, Bruno Maranda, Daniel Bichet et Christiane Auray-Blais.

Statut de l'article: Publié

Martineau T. *et al.* Tandem mass spectrometry analysis of urinary podocalyxin and podocin in the investigation of podocyturia in women with preeclampsia and Fabry disease patients, *Clin Chim Acta*. 2019 Mar 19;495:67-75. doi: 10.1016/j.cca.2019.03.1615.

Avant-propos: Tristan Martineau a accompli le travail de laboratoire à l'origine de cet article. Il a effectué toutes les étapes nécessaires au développement de la méthode de quantification présentée, ainsi que l'analyse des échantillons faisant partie de l'étude, sous l'étroite supervision de Michel Boutin et de Christiane Auray-Blais. Avec l'aide de ces deux co-auteurs, il a rédigé l'article pour lequel il a procédé à l'analyse statistique et à la présentation des résultats sous forme de figures et de tableaux.

Résumé

Les podocytes sont des cellules viscérales hautement différenciées. Plusieurs protéines spécifiques, telles que la podocalyxine et la podocine, peuvent être analysées pour l'évaluation de la podocyturie. Cependant, la quantification précise des protéines liées à la podocyturie est complexe et souvent non fiable. Une méthode de chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été développée et validée pour doser la podocalyxine et la podocine dans le surnageant de l'urine de patients. La quantification protéique a été basée sur la mesure de la concentration équimolaire d'un peptide de la podocalyxine et d'un peptide de la podocine et l'utilisation de standards internes de peptides clivables. Des échantillons d'urine provenant de femmes ayant une grossesse normotensive ou hypertensive, souffrant de diabète gestationnel et de prééclampsie, des patients traités et non traités atteints de la maladie de Fabry (hommes et femmes), de même que des hommes et des femmes contrôles ont été évalués. Les résultats de l'analyse en multiplex montrent que les concentrations de podocalyxine étaient supérieures à celles de la podocine chez l'ensemble des patients et particulièrement élevées chez les femmes enceintes. Les femmes atteintes de prééclampsie présentaient des concentrations anormales de ces deux protéines dans l'urine. Comparée aux valeurs de référence, la sensibilité du test est plus élevée avec la podocalyxine. Des niveaux légèrement supérieurs de podocine ont également été observés chez les hommes Fabry, tandis que les deux protéines présentaient des niveaux élevés chez les femmes Fabry non traitées. Des corrélations ont été établies entre les niveaux de podocalyxine et de podocine et les symptômes cliniques associés à la maladie de Fabry et à la prééclampsie. Cette méthodologie novatrice permet l'analyse simultanée et précise des niveaux de podocalyxine et de podocine dans le surnageant urinaire. Seulement une faible quantité d'échantillon d'urine (1 mL) est nécessaire. Ce projet de recherche a permis d'offrir un outil fiable pour l'évaluation de la podocyturie chez les patients.

Tandem mass spectrometry analysis of urinary podocalyxin and podocin in the investigation of podocyture in women with preeclampsia and Fabry disease patients

Tristan Martineau^a, Michel Boutin^a, Anne-Marie Côté^b, Bruno Maranda^a, Daniel Bichet^c and Christiane Auray-Blais^{a*}

^aDivision of Medical Genetics, Department of Pediatrics, ^bDivision of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Centre de recherche-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

^cSacré-Coeur Hospital, Université de Montréal, Quebec, Canada

* Email: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca; FAX: +1-819-564-5217.

Highlights :

- **Tandem mass spectrometry urinary method for monitoring podocyturia in patients**
- **Quantitation of podocalyxin and podocin in urine by using cleavable peptides**
- **Investigation of podocyturia in Fabry patients and women with preeclampsia**
- **Efficient and rapid method to evaluate kidney involvement in the clinical field**

Abstract

Background: Podocytes are highly differentiated visceral cells, and several related specific proteins, such as podocalyxin and podocin are potential tools for the evaluation of podocyturia. However, precise quantitation of podocyturia-related proteins is complex and often unreliable.

Method: A reversed-phase ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method was developed and validated to quantify podocalyxin and podocin levels in urine supernatant by using specific cleavable peptides and standards. Urine samples from women with normotensive or hypertensive pregnancies, gestational diabetes and preeclampsia, as well as treated and untreated Fabry patients, and gender-matched controls were investigated.

Results: The multiplex analysis shows that podocalyxin levels were higher than podocin levels in patients, the former being particularly higher in pregnant women. Women with preeclampsia had abnormal urine levels of both proteins with a higher sensitivity for podocalyxin. Slightly increased levels of podocin were also observed in Fabry males, while both proteins were increased in untreated Fabry females. Correlations were established between podocalyxin and podocin levels and clinical parameters associated with Fabry disease and pre-eclampsia.

Conclusions: This methodology makes possible the precise, simultaneous and reliable analysis of podocalyxin and podocin levels, and offers a valuable tool for the evaluation of podocyturia.

Key Words

Tandem mass spectrometry (MS/MS), Podocyturia, Fabry disease, Preeclampsia, Podocin, Podocalyxin, Urine

1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is associated with biochemical disturbances contributing to multi-morbidity, kidney failure and a requirement for dialysis or kidney transplantation [1]. The worldwide prevalence of CKD is estimated at 13% and it is recognized as a major contributor to the costs of healthcare [2]. The measurements of albuminuria-creatinine ratio (ACR) and estimated glomerular filtration rate (eGFR) are currently the most widely used predictors of CKD prognosis and kidney involvement [3]. Unfortunately, the use of these conventional tools are not always reliable in the case of the chronic kidney disease occurring in Fabry disease and in preeclampsia [4,5].

Fabry disease is a rare, multisystemic X-linked lysosomal storage disorder (OMIM #301500) caused by mutations in the *GLA* gene (Xq22.1) encoding the enzyme α -galactosidase A (α -gal, EC3.2.1.22) which leads to the impaired catabolism of glycosphingolipids. To date, over 900 mutations in the *GLA* gene are reported leading to Fabry disease [6,7]. The accumulation of globotriaosylceramide (Gb₃), globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) and galabiosylceramide (Ga₂) in the vascular endothelium, different organs, tissues and biological fluids is one of the main biochemical features of Fabry patients. Progressive kidney failure is one of the principal clinical complications of the disease [8,9]. Enzyme replacement therapy (ERT) by infusion of two accepted medications, such as agalsidase beta (1 mg/kg, Fabrazyme, Genzyme-Sanofi) or agalsidase alfa (0.2mg/kg, Replagal, Shire Human Genetic Therapies) has been demonstrated to delay disease progression. Recently, chaperone therapy, a new promising oral treatment, was developed to treat Fabry patients with residual enzyme activity who have amenable mutations [10]. Treatment guidelines depend on mutation types (classical or late-onset), gender and specific clinical manifestations based on organ involvement [11]. However, the diagnosis of Fabry patients is often delayed (sometimes by >15 years) owing to the marked variability in the phenotype and genotype, particularly in late-onset patients having no early signs of the disease [11,12].

Preeclampsia is a gestational hypertensive disorder affecting 3–5% of pregnancies and remains one of the major causes of maternal and fetal mortality and morbidity around the world [13]. The main diagnostic criteria are: 1) hypertension after 20 gestational weeks (systolic pressure ≥ 140 mmHg or diastolic pressure ≥ 90 mmHg); and 2) proteinuria (urinary

protein:creatinine ratio ≥ 30 mg/mmoL); or 3) evidence of other hepatic, neurological, haematological or uteroplacental signs/dysfunction. The most effective treatment is maternal delivery [13,14]. Unfortunately, clinical manifestations in women with preeclampsia are quite variable, or usually appearing late in pregnancy, leading to a delay in the management of affected women [13]. A rise in urinary podocyte levels in preeclampsia patients was observed in previous studies compared to controls [15–17]. Several studies have shown that the evaluation of podocyturia maybe an effective biochemical indicator of kidney damage [18–20]. Podocytes are highly differentiated glomerular cells with limited capacity for cell division that form the interdigitating foot processes located on the outer surface of the glomerular capillaries in the Bowman's capsule [21]. Podocytes are essential for the permeability of the capillary filtration barrier and limit the passage of macromolecules, such as albumin, to the glomerular filtrate. The detachment of podocytes caused by membrane damage may lead to effacement of the foot processes, proteinuria and progressive kidney failure. Several unique proteins such as podocalyxin, podocin, nephrin and synaptopodin are located within these cells or in the extracellular vesicles [21–23]. Effacement of foot processes and increased concentrations of podocytes in the urine inpatients with Fabry disease has been shown to correlate with clinical severity of Fabry nephropathy, and it has been recommended that it be used as a tool to evaluate kidney involvement for the initiation of ERT in some cases [10,23,24].

Current methodologies for the evaluation of podocyturia in patients are challenging. [24–27]. Methods employing the immunofluorescence quantitation of specific proteins, such as by ELISA, and cell counting[22–26], to evaluate podocyturia are time-consuming, offer a limited sensitivity, and are expensive owing to the need to use specific anti-bodies [25,26]. The quantitative analysis of mRNAs by a quantitative polymerase-chain reaction tool (qPCR) has been used to quantify specific podocyte protein mRNAs in urine [16,28,29], but the quality of mRNAs is altered by bacteria contamination leading to increased variability [25,30]. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods were also developed to evaluate podocyturia using protocols to quantify urinary podocalyxin and podocin separately [31–33]. The quantitation strategy was based on the absolute protein quantitation using stable isotope labelled peptides (absolute quantitation (AQUA)) [34]. However, in a recent study, it was shown that the AQUA technique using

stable-isotope-labelling peptides without cleavable sequences may lead to an underestimation of the protein abundance owing to incomplete proteolysis during the sample preparation [35,36]. A methodology based on LC-MS/MS technology offers major benefits for clinical analysis, such as good sensitivity, high specificity, reduced sample volume for analyses, and the possibility of simultaneous protein/peptide analysis, and it is amenable to protein quantitation. Mass spectrometry is a powerful tool for protein quantitation based on the analysis of ions obtained from peptide fragments characteristic of the targeted proteins by proteolytic digestion often using trypsin, which hydrolyzes peptide bonds on the C-terminus side of arginine or lysine residues when not followed by a proline residue [37].

The main objective of this research project was to develop and validate an efficient and robust ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous quantitation of podocalyxin and podocin in urine specimens. This objective was based on a strategy involving a cleavable isotope-labeling peptide to evaluate specific podocyte protein levels in urine. The secondary aim focused on the analysis of podocalyxin and podocin levels in Fabry patients, women with preeclampsia and related gender-matched controls. Overall, this proposed methodology provides evidence supporting a technological transfer to the clinical field for monitoring kidney involvement.

2. Material and methods

2.1. Ethics approval

This multicenter project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences and the Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux de l'Estrie – Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CIUSSS de l'Estrie - CHUS) and the Hôpital du Sacré-Cœur in Montreal, Quebec, respecting the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all Fabry patients, women with preeclampsia and healthy controls.

2.2. Patient and controls selected

Random urine specimens (50 ml) were collected from healthy controls, pathological controls, women with preeclampsia and Fabry patients after obtaining their informed consent. Inclusion criteria were selected according to specific clinical manifestations as follows: all Fabry patients had been previously diagnosed according to the Canadian Fabry Disease Initiative (CFDI) guidelines [38]. Female patients treated by ERT (TFF; n=6) and

males with Fabry on ERT (TFM; n= 11) were either receiving agalsidase-alfa or agalsidase-beta according to the dosage previously described. Untreated Fabry females (UFF; n= 10) and untreated Fabry males (UFM; n= 2) were recruited from among patients who were not eligible for ERT according to the CFDI guidelines. Women with preeclampsia (PE; n=13) were identified by the occurrence of gestational hypertension arising de novo at or after 20 weeks (≥ 140 mmHg systolic or ≥ 90 mmHg diastolic) combined with proteinuria (≥ 30 mg of protein/mmol of creatinine). Women with gestational diabetes (GD; n=9) and pregnant women with hypertension, but not preeclampsia, (HP; n=8) were included as pathological controls because of their potential kidney involvement [39,40]. The diagnosis of gestational diabetes was made according to the Canadian Clinical Practice Guidelines employing the 50-g glucose tolerance test [41]. Pregnant women with hypertension were identified by a rising blood pressure de novo (≥ 140 mmHg systolic or ≥ 90 mmHg diastolic) without other signs or symptoms at or after 20 weeks of gestation. The severity of the hypertension (according to the recommendations of the Canadian guidelines) for this latter group was not taken into account because the number of eligible pregnancies was low [42]. Healthy control males (CM; n=10) and females (CF; n=10) did not have Fabry disease or any other lysosomal storage disorders or nephropathy abnormalities. Normotensive pregnant women had normal blood pressure, and did not have diabetes, nephropathy or other complications of pregnancy. However, patients treated by dialysis or kidney transplant and all participants under 18 years old were excluded from this study. Clinical manifestations other than the ones selected in the inclusion criteria were excluded from this study.

2.3. Materials

2.3.1. Reagents and solvents

Optima LC/MS grade water, isopropyl alcohol (IPA), A.C.S. reagent grade ammonium formate (NH_4HCO_2 , Amm. Form.), and ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) were from Fisher Scientific. Formic acid (FA) (> 99%) was from Acros Organics. HPLC grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were from EMD Chemicals Inc. Dithiothreitol (DTT) (> 98%), iodoacetamide (IAA), sodium deoxycyclate (DOC) (>97%), porcine trypsin IX-S with 13,000–20,000 BAEE units/mg were obtained from Millipore Sigma. OasisTM mixed-mode strong cation-exchange (MCX) cartridges (3 cc, 60 mg) were

from Waters Corp. Synthetic human urine (Surine) was from BioIVT. All buffers were freshly prepared.

2.3.2. Recombinant proteins and synthesized peptide standards

Recombinant podocin (NPHS2, >80%) was from Novus Biologicals while recombinant podocalyxin isoform 2 (PODXL, >80%) was from Creative BioMart. JPT Peptide Technologies GmbH synthesized the stable isotope-labelled (SIL) peptides (APAATVVDVDEV^R*; ATFNPAQDK*), the cleavable stable isotope-labelled (CSIL) peptides (CRAVK/ATFNPAQDK*/CGIRL; PGEPR/APAATVVDVDEV^R*/GSGEE) and their unlabelled counterparts (APAATVVDVDEV^R; ATFNPAQDK; CRAVK/ATFNPAQDK/CGIRL; PGEPR/APAATVVDVDEV^R/GSGEE). Heavy arginine residues (R*) were labelled with ¹³C₆ and ¹⁵N₄ (+10 Da) while heavy lysine residues (K*) were labelled with ¹³C₆ and ¹⁵N₂ (+8 Da). All peptides were quantified by the manufacturing company for quality assessment using an amino acid analysis (AAA) (>98%).

2.4. Sample preparation for the analysis of podocalyxin and podocin

2.4.1. Urine sample specimens

Fresh random urine specimens (50 ml) were collected, homogenized and divided in half: one 25-ml aliquot was centrifuged at 2000×g for 15 min and the other 25-ml aliquot was saved uncentrifuged. The supernatant of the centrifuged urine samples (the sediments were discarded) and the uncentrifuged specimens were stored at -80 °C until analysis. Creatinine concentration, albuminuria and proteinuria levels were measured in the uncentrifuged samples with the automated Modular P system from Roche at the Biochemical Clinical Laboratory at CIUSSS de l'Estrie-CHUS. Total urinary Gb₃ on filter paper and lyso-Gb₃ in urine specimens were analyzed in our laboratory according to published methods [44,43]. One milliliter of urine supernatant was transferred to a 2 ml polypropylene tube with a screw cap along with 20 µl of 100nmol/l of podocalyxin and podocin CSIL as the internal standards. A volume of 100 µl of 7 mg/ml DOC prepared in 550 mmol/l NH₄HCO₃ (pH 8), followed by 100 µl 225 mmol/l DTT prepared in 50 mmol/l NH₄HCO₃ were added to the samples, followed by a 30 min incubation at 60 °C (Incubating Orbital Shaker, VWR, operated at 255rpm) to reduce the disulfide bonds. After adding 250 µl of 180 mmol/l IAA prepared in 50 mmol/l NH₄HCO₃, samples were incubated for 30 min in the dark at room temperature (23 °C) to alkylate the cysteine residues. Enzymatic digestion was performed

with 50 µg porcine trypsin IX-S and incubated 2 h at 37 °C with orbital shaking (225 rpm). The reaction was quenched with 30 µL 25% F.A. and then centrifuged at 9400×g for 10 min to eliminate the DOC precipitate before the sample loading on a solid phase extraction OASIS™ MCX cartridge (3 cc, 60 mg) previously conditioned with 1 ml MeOH and 1 ml H₂O containing 0.5% F.A.. Cartridges were washed consecutively with 1 ml 70:30 H₂O:MeOH containing 0.5% F.A., 1 ml H₂O containing 0.5% F.A., 1 ml 200 mmol/l Amm. Form., and eluted in a 5 ml polypropylene tube with 1 ml 80:20 (100 mmol/l Amm. Form.:ACN). Extracted samples were evaporated for 3 h at 45 °C with a SpeedVac (SPD131DDA ThermoFisher Scientific) at 1 Torr and reconstituted in 100µl 85:15 H₂O:ACN containing 0.5% F.A. before filtration on a 0.2µm PTFE syringe filter. Analyses were done on an Acquity I-Class ultra-performance liquid chromatography system (UPLC, Waters) coupled to a Xevo TQ-S tandem mass spectrometer (MS/MS, Waters).

2.4.2. Calibration curves

Peptide calibration point solutions were prepared with cleavable peptides of podocalyxin and podocin in 50:50 MeOH:H₂O containing 0.1% F.A. at the following concentrations: 6.25; 12.5; 25; 50; 100; 200; 300 and 400 nmol/l. To avoid interferences of residual podocyte pro-teins in the calibration curve, 1 ml of urine was replaced by a synthetic human urine (Surine) combined to 20 µl of the respective peptide calibration point solutions. A final 9 point-calibration curve for the proteins of interest was obtained: 0; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 6000 and 8000 pmol/l.

2.5. Instrumentation and parameters

The analysis of tryptic peptides from the respective recombinant proteins was performed in order to select the appropriate peptide for the quantitation of podocalyxin and podocin. The separation of peptides was done on the Acquity I-Class UPLC system with a linear gradient reversed-phase UPLC method to reduce the matrix effect. The UPLC system was coupled to a Xevo TQ-S mass spectrometer working in positive electrospray ionization (ESI+) using the multiple reaction monitoring (MRM) mode. To determine the appropriate fragment ions used for the MRM analysis, produced y-ions in the MS/MS collision cell were analyzed and compared with Skyline 4.2 software (MacCoss LabSoftware). Optimal UPLC-MS/MS parameters of the selected podocalyxin and podocin peptides are shown in Table 1. The method was validated and the MRM results were obtained using the Mass Lynx-Target

Lynx V4.1 (SCN 945) software (Waters). The quadratic calibration curves were forced to the origin and a 1/x weighing was applied.

Chromatography Parameters			MS Parameters		
Column	CORTECS T3 (Waters Corps.)		Ionization Mode	ESI +	
ID x length	2.1 x 50 mm		Acquisition Mode	MRM	
Particle size	1.6 µm		Capillary Voltage	3.0 kV	
Temperature	35°C		Nebuliser Gas Flow	6.0 Bar	
Flow Rate	0.6 mL/min		Cone Gas Flow	500 L/h	
Injection Volume	7.5 µL (partial loop)		Source Offset Voltage	90 V	
Mobile Phase A	100% ACN + 0.1% F.A.		Desolvation Temperature	600°C	
Mobile Phase B	100% H ₂ O + 0.1% F.A.		Desolvation Gas Flow	1200 L/h	
Weak Wash	3000 µL 95% H ₂ O / 5% ACN + 0.1% FA		Collision Gas Flow	0.15 mL/min	
Strong Wash	1000 µL 60% ACN / 30% IPA / 10% H ₂ O + 0.2% FA		Source Temperature	150°C	
Time (min)	Mobile Phase %	Gradient type	Compound	Podocalyxin	Podocin
0.0-1.5	5% A	Isocratic	Ion – y	[ATFNPAQDK+2H] ²⁺ - (y ₅)	[APAATVVDVDEVR+2H] ²⁺ - (y ₇)
1.5-6.0	5-17% A	Linear	MRM Transition – peptide	m/z 496.25>558.29	m/z 671.35>831.42
6.0-7.0	17-100% A	Linear	MRM Transition – IS	m/z 500.25>566.29	m/z 676.35>841.42
7.0-8.0	100% A	Isocratic	Cone Voltage	20 V	30 V
8.0-9.0	100-5% A	Linear	Collision Energy	15 V	26 V
9.0-10.0	5% A	Isocratic	Dwell Time	0.12 s	0.06 s

IS: internal standard; ACN: acetonitrile; IPA: isopropyl alcohol; H₂O: water; FA: formic acid; MS: mass spectrometry; MRM: multiple reaction monitoring; UPLC: ultra performance liquid chromatography; ID: internal diameter.

Table 1. UPLC and MS/MS method parameters for the analysis of urine specific peptides (at equivalent molar concentrations) for podocalyxin and podocin.

2.6. Method validation

The method validation was performed for research purposes. Spiked urine quality controls (U-QCs) and spiked synthetic urine quality controls (S-QCs), with selected cleavable peptides of podocin and podocalyxin, were prepared at final concentrations of 0.3 nmol/l (LQC), 2.5 nmol/l (MQC) and 5.0 nmol/l (HQC). All QCs were individually prepared in 2 ml polypropylene tubes aiming at a final volume of 1 ml. The S-QCs were used to evaluate assays for intraday (n=5) and interday (n=5) accuracy in order to prevent endogenous podocyte proteins to interfere with the accuracy evaluation, while U-QCs were used to evaluate precision. U-LQCs and U-HQCs were used to evaluate the sample stability at different times and temperatures: 24 h at room temperature (22°C) (n=3), 1 week at 4°C (n=3), 2 weeks at -20°C (n= 3), and 2 weeks at -80°C (n=3). The effect of 5 freeze-thaw cycles (n=3) was also assessed for both proteins. The stability of the reconstituted U-QCs was also evaluated up to 48 h in the autosampler at 20°C (n=5) and their adsorption to polypropylene tubes was evaluated after 5 transfers (n= 3). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were established as 3 and 10 times the standard deviations of the analyte response, respectively, which was obtained after 5 injections of S-LQC. The

overall sample preparation recovery was evaluated by comparing U-LQC and U-HQC containing cleavable peptides at concentrations initially known and the equivalent matrix containing peptides without cleavable ends, spiked after the evaporation step (n= 5). The matrix effects (suppression or enhancement of ion signals) were evaluated using a post-column infusion strategy. Urine samples with different creatinine concentrations (3.4 to 18.6 mmol/l) and total protein concentrations (0 to 1.05 mg/ml), and the reconstitution solution (85:15 H₂O:ACN containing 0.5% F.A) were analyzed by UPLC separation to evaluate different matrix compositions. At the same time, the signal of the SIL peptides infused at a concentration of 10 nmol/l with a flow rate of 20 µl/min was monitored to measure ion suppression or enhancement at the retention times of the analytes.

2.7. Statistical analyses

IBM SPSS Statistics 24 software (SPSS, Armonk, New York, USA) was used for all statistical analyses. Comparisons between different biomarker levels from pathological controls, patients and healthy controls were performed using the non-parametric Mann-Whitney *U* test. Normal values for podocalyxin and podocin were established gender-wise with a 95th percentile measurement of biomarker levels in urine from the respective healthy controls, and the pregnancy status for women with preeclampsia. Reference values were used to calculate the sensitivity (true positive/(true positive + false negative)) and the specificity (true negative/(true negative + false positive)) and to determine the area under the curve (AUC) of receiver operating characteristic (ROC) to evaluate the diagnostic reliability of podocalyxin and podocin as biomarkers of podocyturia. Correlations between podocyturia proteins and clinical manifestations were evaluated with the non-parametric Spearman test.

3. Results

3.1. Selection of the podocalyxin and podocin peptide sequences for UPLC-MS/MS analysis

Selection of the appropriate peptide sequences for the protein quantitation by MS/MS in MRM mode was crucial to ensure the reproducibility, robustness and highest sensitivity of the methodology. Briefly, we selected tryptic peptide sequences with a minimum of 8 amino acids for specificity and a maximum of 25 amino acids for sensitivity. We also favoured

sequences with the minimum number of residues subject to phosphorylation such as serine, threonine or tyrosine to ensure reproducibility of the assay [30]. As mentioned previously, recombinant proteins of podocalyxin and podocin were digested with trypsin and were analyzed as described in the Supplementary information methodology 1 and 2. Fig. 1A shows three proteolytic peptides producing the highest signals for podocalyxin (ATFNPAQDK, ANEILA-SVK and LASVPGSQTVVVK), whereas Fig. 1C shows the ones related to podocin (APAATVVDVDEVR, MAAEILSGTPAAVQLR and QEAGPEPSGSGR). The 3 most abundant fragment ions were analyzed to evaluate the most sensitive y-ion produced by MS/MS from the selected peptides. Fig. 1B and D show the respective y-ion profiles generated from the doubly charged precursor ions for both analyzed peptides. The singly charged fragment y_5 ion (m/z 558.29) from the ATFNPAQDK doubly charged precursor ion (m/z 496.25) and the singly charged fragment y_7 ion (m/z 831.42) from the APAATVVDVDEVR doubly charged precursor ion (m/z 671.35) were selected for the MRM transitions (Table 1). Although they were all unique, ATFNPAQDK and APAATVVDVDEVR had been conserved for the development of the quantitative method because of their sensitivity endogenously and their limited number of post-translational modifications compared to other peptide sequences.

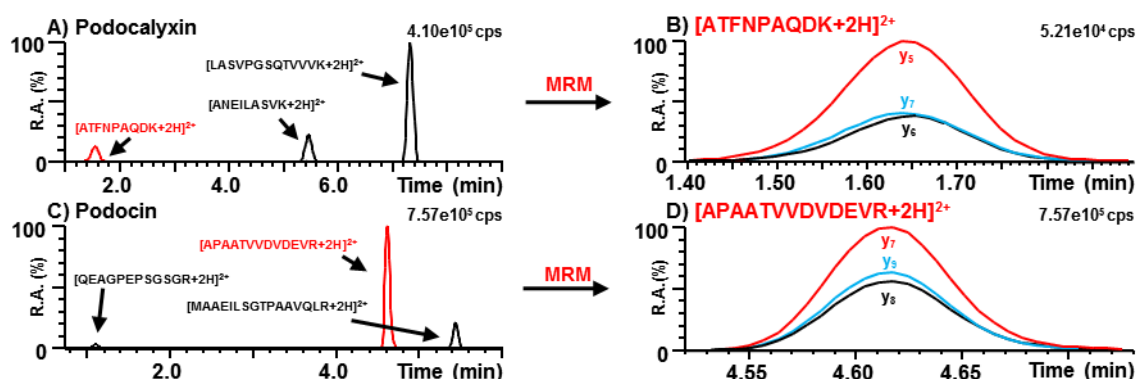


Fig. 1. Selection of specific peptides for the MS/MS quantitation of podocalyxin and podocin in MRM mode. A) Ion chromatogram of three tryptic peptides from recombinant podocalyxin protein (59.2 nmol/l) with their highest y-ion signal; B) Overlay of the ion chromatograms created by the MRM of 3 y-ions produced by the fragmentation of [ATFNPAQDK+2H]²⁺ precursor ion; C) Ion chromatogram of three tryptic peptides from the recombinant podocin protein (21.3 nmol/l) with their highest y-ion signal; D) Overlay of

the ion chromatograms created by the MRM of three y-ions produced by the fragmentation of [APAATVVDVDEV^R+2H]²⁺ precursor ion. R.A.: Relative abundance (%).

MS/MS methods previously developed for the individual quantitation of podocalyxin and podocin using the AQUA quantification strategy selected the same peptides [32,33]. One major limitation of these methods is that the use of internal standards without cleavable sequences could under-estimate the endogenous protein concentrations in urine because of incomplete trypsin digestion. The use of stable isotopic labelled proteins as internal standards was suggested as the most appropriate approach to resolve this issue [36]. However, these protein standards are difficult to produce and quite expensive. Hence, as a compromise, cleavable stable isotope-labelled (CSIL) peptides and their native sequences were synthesized, adding 5 amino acids to the original protein sequences to the N-terminus and the C-terminus to our selected peptides (Podocalyxin: CRAVK/ATFNPAQDK/CGIRL, and podocin: PGEPR/APAATVVDVDEV^R/GSGEE) to compensate for missed-cleavages during the tryptic digestion.

3.2. Method validation results

LOD, LOQ, intra- and interday accuracy and precision assays for podocalyxin and podocin are summarized in Supplementary material (Table S-1), while recovery of sample preparation and polypropylene adhesion assays are summarized in Supplementary material (Table S-2), and all stability results are shown in Supplementary material (Table S-3). LOD measured for podocalyxin and podocin target peptides were 17.1 and 19.0 pmol/l, respectively. The LOQ obtained was 56.9 and 63.3 pmol/l, respectively. Precision (% RSD, Relative Standard Deviation) assays were $\leq 6.5\%$ and accuracy assays (% bias) were $\leq 13.9\%$ for both peptides of podocalyxin and podocin at different concentrations, except for the S-LQC intraday of podocalyxin and S-LQC and S-HQC intraday of podocin bias assays which were 15.9%, 16.4% and 17.4%, respectively, because of an outlier in the 5 replicates. By excluding the outlier, biases were reduced under 15%. Overall recoveries of sample preparation were between 65.2 and 69.8%, respectively, for LQC and HQC for the podocalyxin peptide, while they were between 72.9 and 81.2% for the podocin peptide. The maximum bias obtained for the adhesion to polypropylene tube assays after 5 transfers was

under 2.5% for podocalyxin and podocin peptides. Cleavable targeted peptides were stable for at least 24 h at 22°C (biases < 15.5%), at one week at 4°C (biases ≤ 13.1%), at least 2 weeks at –20°C (biases ≤ 10.7%), and –80 °C (biases ≤ 11.8%) and even after 5 freeze-thaw cycles (biases ≤ 4.1%). Extracted LQC and HQC were stable at least 48 h in the autosampler at 20°C (biases ≤ 6.0%).

The matrix effect was investigated to monitor the ion suppression on targeted peptides during MS/MS quantitation with three different urine sample matrices with creatinine levels varying between 3.4 and 18 mmol/l, and total protein levels between 0 and 1.05 mg/ml. The reconstitution solution (85% H₂O; 15% ACN; 0.5% F.A.) was defined as showing no ion suppression and was compared to the other matrices. As shown in Fig. 2, the ion suppression in a urine matrix without proteinuria was under 25.7%, but was greater in samples with higher creatinine concentration, especially for the targeted peptide of podocin. However, the impact of ion suppression was remarkably greater in urine with proteinuria especially for ATFNPAQDK (–40.0%) compared with APAATVVDVDEVR (–25.7%). An assay with the quadrupole time of flight mass spectrometer (QTOF) confirmed that the increased ion suppression was caused by the coelution of some tryptic peptides of human serum albumin which is the one of the most abundant proteins found in urine [45]. This latter assay is described in the Supplementary material, and results are summarized in Fig. S-1 and S-2.

3.3. Podocalyxin and podocin levels in random urine samples

The groups under study were subdivided according to pathological criteria, gender and treatment (Fabry patients only). For the Fabry disease groups, the levels of podocalyxin and podocin were compared to gender-matched controls. In the preeclampsia groups, podocalyxin and podocin levels were compared with healthy non-pregnant women (CF) and women with normotensive pregnancies (NP). Women with gestational diabetes (GD) and hypertensive pregnancies (HP) were used as pathological controls. Age, gender, eGFR measurements, diastolic blood pressure (DBP), systolic blood pressure (SBP), gestational age, age at delivery and α -gal activity in plasma are summarized in Table 2. Levels of podocalyxin, podocin, proteinuria, albuminuria, total Gb₃ on filter paper and lyso-Gb₃ in urine specimens normalized to creatinine are shown in Table 3. Total Gb₃ and lyso-Gb₃ were

measured in healthy controls (without pregnancy) and in Fabry patients. Fig. 3 shows the box plot comparisons of podocalyxin and podocin levels in different study groups.

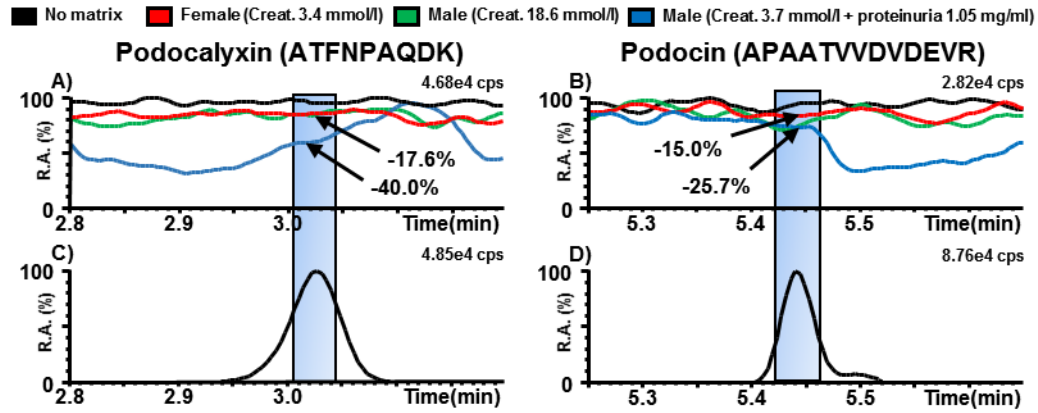


Fig. 2. Matrix effect evaluation for ATFNPAQDK and APAATVVDVDEVR for podocalyxin and podocin peptides, respectively, with 2 urine samples from healthy controls with different creatinine concentrations (3.4 and 18.6 mmol/l) and 1 urine sample from a patient with proteinuria (1.05mg/ml). A) Ion signal of infused SIL of ATFNPAQDK*; B) Ion infusion of SIL of APAATVVDVDEVR*; C) Ion chromatogram of ATFNPAQDK; D) Ion chromatogram of APAATVVDVDEVR; Infusion concentration = 10 nmol/l; Injection volume = 7.5 μ l; Peptide concentration = 5 nmol/l; Infusion flow rate = 20 μ l/min; R.A.: Relative abundance (%).

Table 2. Demographics and clinical characteristics of pathological controls, women with preeclampsia and Fabry patients. Male and female controls are also included. Median values are shown.

	Age (years)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	DBP (mm Hg)	SBP (mm Hg)	GA (weeks)	DA (weeks)	α -galA activity (nmol/h/mg prot.)
Fabry Groups							
CM (n=10)	41 (25-63)	n/m	n/m	n/m	n/a	n/a	n/m
CF (n=10)	39 (22-67)	n/m	n/m	n/m	n/a	n/a	n/m
TFM (n=11)	38 (23-62)	82 (29-121)	79 (60-89)	117 (100-149)	n/a	n/a	4.0 (0.9-6.3)
TFF (n=6)	59 (49-70)	81 (53-92)	77 (68-90)	112 (100-142)	n/a	n/a	33.0 (11.0-68.0)
UFF (n=2)	39 (33-44)	77 (69-86)	n/m	n/m	n/a	n/a	3.2 (2.4-4.0)
UFF (n=10)	48 (19-77)	88 (55-138)	84 (54-88)	132 (96-164)	n/a	n/a	23.3 (0.0-61.0)
Preeclampsia Groups							
CF (n=10)	39 (22-67)	n/m	n/m	n/m	n/a	n/a	n/m
NP (n=15)	31 (20-37)	120 (78-120)	74 (57-84)	120 (97-132)	31.2 (28.0-36.6)	41.9 (38.0-47.6)	n/a
GD (n=9)	30 (28-40)	120 (107-120)	68 (50-89)	103 (90-132)	39.1 (32.0-45.6)	41.4 (39.0-45.1)	n/a
HP (n=8)	27 (22-35)	120 (94-120)	87 (84-98)	131 (116-150)	39.4 (34.0-43.6)	38.4 (37.0-43.3)	n/a
PE (n=13)	27 (21-37)	116 (86-120)	90 (82-118)	148 (135-180)	38.1 (31.9-41.7)	37.7 (31.4-44.6)	n/a

eGFR: estimated glomerular filtration rate; DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure; GA: gestational age; DA: delivery age; CM: control males; CF: control females; TFM: ERT-treated Fabry males; TFF: ERT-treated Fabry females; UF: Untreated Fabry males; UFF: Untreated Fabry females; NP: women with normotensive pregnancies; GD: women with gestational diabetes; HP: women with hypertensive pregnancies; PE: women with preeclampsia; n/m: not measured; n/a: not applicable; (j): minimum and maximum value in a group

Table 3. Total Gb₃, lyso-Gb₃, podocalyxin, podocin, proteinuria and albuminuria median values were measured in urine normalized to creatinine according to each study group.

	Podocalyxin/Creat. (pmol/mmol)	Podocin/Creat. (pmol/mmol)	Prot./Creat. (mg/mmol)	Alb./Creat. (mg/mmol)	Total Gb ₃ /Creat. (μg/mmol)	Lyso-Gb ₃ /Creat. (pmol/mmol)
Fabry Groups						
CM (n=10)	25.3 (16.0-39.3)	0.0 (nd-3.0)	10.0 (5.1-29.4)	0.5 (0.2-1.5)	5.5 (2.2-39.7)	nd
CF (n=10)	32.6 (18.7-46.1)	0.0 (nd-3.9)	15.1 (4.0-47.6)	0.6 (0.3-2.4)	7.0 (3.5-30.6)	nd
TFM (n=11)	34.8 (21.2-72.0)	3.8 (nd-7.4)	73.5 (4.5-283.8)	47.7 (0.3-271.4)	30.4 (6.4-789.0)	52.2 (3.4-683.7)
TFF (n=6)	42.9 (22.8-59.3)	0.8 (nd-6.7)	35.5 (6.7-76.5)	15.4 (0.3-55.3)	23.4 (7.2-70.7)	16.3 (7.0-38.1)
UFM (n=2)	36.8 (28.0-45.5)	4.7 (3.0-6.4)	130.0 (122.0-138.0)	116.1 (109.0-123.2)	626.8 (560.6-692.9)	546.2 (384.8-707.5)
UFF (n=10)	54.5 (28.4-113.5)	3.2 (nd-8.1)	18.6 (6.3-55.6)	1.8 (1.0-8.4)	77.0 (13.8-253.3)	19.5 (nd-143.7)
Preeclampsia Groups						
CF (n=10)	32.6 (18.7-46.1)	0.0 (nd-3.9)	15.1 (4.0-47.6)	0.6 (0.3-2.4)	7.0 (3.5-30.6)	nd
NP (n=15)	56.4 (36.4-79.0)	3.6 (nd-6.5)	12.4 (6.2-29.4)	0.5 (0.3-11.0)	n/m	n/m
GD (n=9)	57.4 (39.9-116.6)	5.1 (1.3-8.3)	11.7 (6.3-32.3)	0.6 (0.3-1.3)	n/m	n/m
HP (n=8)	85.0 (55.6-205.8)	4.4 (nd-14.6)	11.5 (8.4-72.6)	1.2 (0.4-39.8)	n/m	n/m
PE (n=13)	232.6 (55.0-792.4)	8.4 (4.4-23.8)	67.9 (11.6-1544.4)	40.8 (1.8-888.9)	n/m	n/m

Prot.: proteinuria; Alb.: albuminuria; Creat.: creatinine; CM: control males; CF: control females; TFM: ERT-treated Fabry males; TFF: ERT-treated Fabry females; UFM: untreated Fabry males; UFF: untreated Fabry females; NP: women with normotensive pregnancies; GD: women with gestational diabetes; HP: women with hypertensive pregnancies; PE: women with preeclampsia; n/m: not measured; nd: not detected.

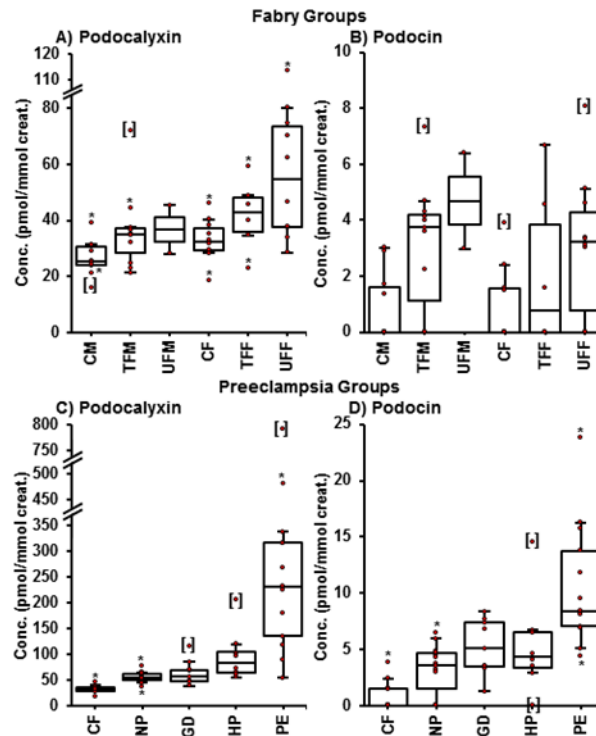


Fig. 3. Box plots of the urinary levels measured of podocalyxin (ATFNPAQDK) and podocin (APAATVVDVDEVR) normalized to creatinine (pmol/mmol creatinine) in Fabry and preeclampsia groups by using cleavable peptide standards. Upper box plots represent normalized urinary levels measured of: A) Podocalyxin and B) Podocin for control males

(CM), ERT-treated Fabry males (TFM), untreated Fabry males (UFM), control females (CF), ERT-treated Fabry females (TFF) and untreated Fabry females (UFF) as Fabry groups. Lower box plots represent normalized urinary levels of: C) Podocalyxin and D) Podocin for control females (CF), women with normotensive pregnancies (NP), women with gestational diabetes (GD), women with hypertensive pregnancies (HP); and women with preeclampsia (PE) in the preeclampsia groups. The lower and upper limits shown by the box plots are the 25th and 75th percentiles. Center horizontal box line is the median. The whiskers correspond to the highest and lowest non outlier values. Values over 1.5 times the range between the median and the third quartile over the upper box limit and over 1.5 times the range between the median and the first quartile under the lower box limit represent outliers (*). Values over 3 times the range between the median and the third quartile over the upper box limit and over 3 times the range between the median and the first quartile under the box limit represent extreme outliers []

Our results show that the proteinuria, albuminuria and blood pressure levels measured for each group matched the clinical manifestations of patients; statistically significant differences ($p < .05$) were assessed with the use of the non-parametric Mann Whitney *U* test (Supplementary material Table S-4). As expected, proteinuria, albuminuria, total Gb₃ and lyso-Gb₃ concentrations varied between ERT-treated and untreated Fabry groups. Fabry disease is an X-linked disorder where females tend in general to present lower levels of glycosphingolipid than males [46]. Fabry patients with classical *GLA* mutations also present higher biomarker concentrations than those with mutations associated with late-onset disease [43,47]. For this study, Fabry subjects with classical mutations were observed in our Fabry patient groups (Supplementary material Table S-5).

Areas under the ROC curves (AUCs) were used to assess the efficacy of podocalyxin and podocin levels to discriminate patients from controls. Our results show that podocalyxin concentrations were 16.3 (from 7.9 to 53.7) times higher than podocin concentrations. For the Fabry groups (UFM, UFF, TFM, TFF), results showed that the podocalyxin concentrations were significantly higher in control females (CF) than males (CM) ($p = .041$). A significantly higher concentration of podocin for Fabry males was observed compared to CM. In fact, the AUC was slightly higher in UFM ($p = .039$; AUC = 0.95) than TFM ($p = .019$;

AUC=0.79), but no significant differences were observed between treated and untreated Fabry males ($p > .05$). Regarding Fabry females, podocalyxin and podocin levels were only significantly elevated in untreated females with an AUC for podocalyxin slightly higher ($p = .016$; AUC=0.82) than podocin ($p = .048$; AUC =0.75). The increased of podocyte proteins in urine may be consistent with the accumulation of Gb₃ in podocytes of Fabry patients [10].

For the preeclampsia groups (NP, GD, HP, PE), podocalyxin and podocin levels were significantly higher in pregnant women compared to non-pregnant women (Podocalyxin: $p < .001$; Podocin: $p = .016$). We thus selected the normotensive pregnant (NP) women group as normal reference controls for all pregnant women. A significant elevation of podocalyxin levels was observed for hypertensive (HP) and women with preeclampsia (PE) compared to the normal reference group (NP). We observed that AUC values were slightly higher for the PE group ($p < .001$; AUC=0.95) compared to the HP group ($p = .005$; AUC=0.87). Higher concentrations of podocin were also observed, but only for PE ($p < .001$; AUC=0.96). Biomarker levels in the PE group were significantly higher than HP for both podocalyxin and podocin. No significant differences were observed between NP and GD ($p > .05$). Our results for preeclampsia women are consistent with recent findings showing an elevation of urinary extracellular vesicles and in solution podocyte protein in women with preeclampsia [48].

3.4. Normal values for podocalyxin and podocin in random urine samples

Normal values were defined as the 95th percentile measured in control groups to assess the sensitivity and specificity of the podocalyxin and podocin values obtained for each group (Table 4).

For the Fabry groups, reference values were established from healthy controls according to gender, and the normotensive pregnancy group (NP) was the reference control group for the preeclampsia groups due to the higher level of podocalyxin and podocin compared to the non-pregnant control group. The specificity of podocalyxin and podocin was 93.3% for the preeclampsia groups compared to the NP reference group, and 90% for the Fabry groups compared to controls. The sensitivity of podocalyxin was equal or greater than the sensitivity of podocin in DG, HP, PE, TFF and UFF. Interestingly, the sensitivity of podocin was higher than the sensitivity of podocalyxin in TFM and UFM. However, the

sensitivity of both proteins were greater in PE and untreated Fabry patients compared to healthy controls and ERT-treated Fabry patients. We observed that the sensitivities of the measurements of podocalyxin and podocin in some groups of subjects were low probably due to the reduced number of patients involved in these groups.

	Podocalyxin	Podocin
Fabry Groups		
Normal values	♂: 35.7 ; ♀: 43.6	♂: 3.0 ; ♀: 3.2
(unit)	(pmol/mmol creat.)	(pmol/mmol creat.)
Sensitivity		
TFM (n=11)	36.4%	63.6%
TFF (n=6)	50.0%	33.3%
UFM (n=2)	50.0%	100.0%
UFF (n=10)	60.0%	50.0%
Specificity	90.0%	90.0%
Preeclampsia Groups		
Normal values	♀ pregnant: 69.4	♀ pregnant: 6.1
(unit)	(pmol/mmol creat.)	(pmol/mmol creat.)
Sensitivity		
DG (n=9)	44.4%	44.4%
HP (n=8)	62.5%	37.5%
PE (n=13)	92.3 %	84.6%
Specificity	93.3%	93.3%

CM: control males; CF: control females; TFM: ERT-treated Fabry males; TFF: ERT-treated Fabry females; UFM: untreated Fabry males; UFF: untreated Fabry females; NP: women with normotensive pregnancies; GD: women with gestational diabetes; HP: women with hypertensive pregnancies; PE: women with preeclampsia; ♀: Female; ♂: Male.

Table 4. Normal values, sensitivity and specificity for podocalyxin and podocin. Normal values correspond to the 95th percentile from NP (n= 15) for pregnant women samples and healthy controls CM (n= 10) and CF (n= 10) for the Fabry groups.

3.5. Correlations with symptoms

Correlations were found between podocalyxin and podocin levels and different clinical parameters for the Fabry groups (CF, CM, TFM, UFM, TFF, UFF) and the preeclampsia groups (NP, GD, HP, PE) (Table 5) using the non-parametric Spearman test (significant correlation: $p < .05$). In the preeclampsia groups, blood pressure, albuminuria and proteinuria levels positively correlated with podocalyxin and podocin levels, while gestational delivery age negatively correlated. In the Fabry groups, urinary lyso-Gb₃ levels showed positive correlations with podocalyxin and podocin levels, while total urinary Gb₃ levels showed a positive correlation only with podocalyxin levels. The rho correlation Spearman values were higher for the preeclampsia groups compared to the Fabry groups.

	Podocalyxin	Podocin
Fabry Groups		
Podocalyxin (pmol/mmol creat.) (n=49)	n/a	0.395**
Podocin (pmol/mmol creat.) (n=49)	0.395**	n/a
Urinary Lyso-Gb ₃ (pmol/mmol creat.) (n=49)	0.306*	0.522**
Urinary Total Gb ₃ (µg/mmol creat.) (n=49)	0.298*	n/s
Preeclampsia Groups		
Podocalyxin (pmol/mmol creat.) (n=45)	n/a	0.804**
Podocin (pmol/mmol creat.) (n=45)	0.804**	n/a
Proteinuria (mg/mmol creat.) (n=45)	0.607**	0.509**
Albuminuria (mg/mmol creat.) (n=45)	0.729**	0.636**
DA (weeks) (n=45)	-0.524**	-0.439**
DBP (mm Hg) (n=45)	0.701**	0.556**
SBP (mm Hg) (n=45)	0.729**	0.538**

DA: delivery age; DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure;
n/s: not significant; n/a: not applicable; *: p<0.05; **: p<0.01

Table 5. Correlations established for podocalyxin and podocin levels and clinical parameters observed in the Fabry and preeclampsia groups using the non-parametric Spearman test (Fabry groups: CF, CM, TFM, UFM, TFF, UFF; Preeclampsia groups: CF, NP, GD, NP, PE). Values: Spearman rho.

4. Conclusions

To our knowledge, this is the first time that a validated UPLC-MS/MS method for simultaneous quantitation of podocalyxin and podocin levels in urine using cleavable peptide standards is reported. Liquid chromatography parameters were optimized and specific selected peptides were used to independently assess both biomarkers and to evaluate podocyturia in patients with potential renal damage. Only 1ml of supernatant of random urine samples was necessary to establish that podocalyxin levels were significantly higher than podocin levels in patients under study and particularly higher in urine samples from females compared to males. Podocalyxin and podocin levels in women with preeclampsia were significantly higher than controls. Podocalyxin levels were more sensitive for women with preeclampsia and untreated Fabry females compared to podocin levels. By contrast, podocin appeared to be a more appropriate biomarker for Fabry males not on ERT compared to podocalyxin based on the sensitivity and the specificity of the results; however, this might also be due to the low concentrations of biomarkers in this latter group. Podocalyxin and podocin levels correlated well with several clinical parameters for women with preeclampsia and Fabry patients evaluated in this study. Interesting correlations were observed between lyso-Gb₃, Gb₃ and podocyte proteins, but the limited number of recruited patients may affect

the results and is considered as a limitation for this study. According to our results, this mass spectrometry methodology is useful as a clinical investigative tool to quantify podocycturia proteins simultaneously in the urine of targeted patients. It also offers an alternative tool to evaluate kidney involvement earlier for affected patients.

Acknowledgements

We acknowledge the dedicated collaboration of Caroline Barr and Julie Moreau at CIUSSS de l'Estrie-CHUS in Sherbrooke and Marie-Françoise Arthus, Carole Fortier and Claudia Ménard from the Hôpital-Sacré Coeur in Montreal for the sample collection. We would like to sincerely thank Dr. Joe T.R. Clarke for his scientific expertise. We are also grateful to Waters Corp. for their continued scientific support and partnership. We thank all patients and reference controls who generously provided urine samples for this study.

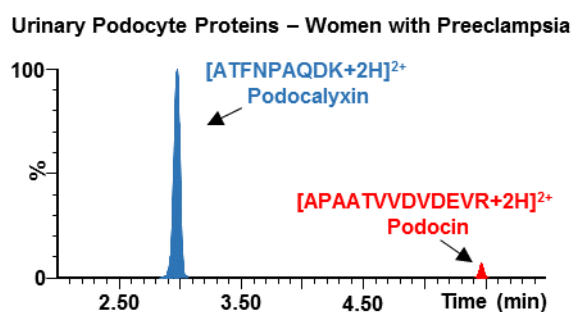
Funding

A student grant was provided by la Fondation des étoiles (Montreal, QC). Personal research funds from Professor C. Auray-Blais made this study possible.

Appendix A. Supplementary data

The Supplementary material is available free of charge on the *Clinical Chimica Acta* Publications website. Page S-1 shows Supplementary protocols for recombinant proteins and HSA peptide analysis, as well as Supplementary Tables and Figures. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.1615>.

Graphical Abstract



REFERENCES

- [1] A. Levin, M. Tonelli, J. Bonventre, J. Coresh, J.A. Donner, A.B. Fogo, C.S. Fox, R.T. Gansevoort, H.J.L. Heerspink, M. Jardine, B. Kasiske, A. Köttgen, M. Kretzler, A.S. Levey, V.A. Luyckx, R. Mehta, O. Moe, G. Obrador, N. Pannu, C.R. Parikh, V. Perkovic, C. Pollock, P. Stenvinkel, K.R. Tuttle, D.C. Wheeler, K.U. Eckardt, Global Kidney Health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, re-search, and policy, *Lancet*. 390 (10105) (2017) 1888–1917, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30788-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30788-2).
- [2] N.R. Hill, S.T. Fatoba, J.L. Oke, J.A. Hirst, C.A. O'Callaghan, D.S. Lasserson, F.D. Hobbs, Global prevalence of chronic kidney disease – a systematic review and meta-analysis, *PLoS One* 11 (7) (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158765.g002e0158765>.
- [3] D.M. Nash, S. Brimble, M.R. Maureen, E. McArthur, K. Tu, G.E. Nesrallah, A. Grill, A.X. Garg, Quality of care for patients with chronic kidney disease in the primary care setting: a retrospective cohort study from Ontario, Canada, *Can. J. Kidney Health Dis.* 4 (2017), <https://doi.org/10.1177/2054358117703059205635811770359>.
- [4] K. Pennington, J.M. Schlitt, D.L. Jackson, L.C. Schulz, D.J. Schust, Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease, *Dis. Model. Mech.* 5 (1) (2012) 9–18, <https://doi.org/10.1242/dmm.008516>.
- [5] C. Tøndel, T. Kanai, K.K. Larsen, S. Ito, J.M. Politei, D.G. Warnock, E. Svarstad, Foot process effacement is an early marker of nephropathy in young classic Fabry patients without albuminuria, *Nephron*. 129 (1) (2015) 16–21, <https://doi.org/10.1159/000369309>.
- [6] G. Duro, C. Zizzo, G. Cammarata, *et al.*, Mutations in the GLA gene and lyso-Gb3: is it really Anderson-Fabry disease? *Int. J. Mol. Sci.* 19 (12) (2018), <https://doi.org/10.3390/ijms19123726e3726>.
- [7] Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.org>, 2019 (accessed 10 January 2019).
- [8] J.T.R. Clarke, Narrative review: Fabry disease, *Ann. Intern. Med.* 146 (2007) 425–433.

- [9] H. Abensur, M.A.D. Reis, Renal involvement in Fabry disease, *J. Bras. Nefrol.* 38 (2)(2016) 245–254, <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20160034>.
- [10] D.P. Germain, D.A. Hughes, K. Nicholls, D.G. Bichet, Treatment of Fabry's disease with the pharmacologic chaperone Migalastat, *N. Engl. J. Med.* 375 (6) (2016) 545–555, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510198>.
- [11] A. Ortiz, D.P. Germain, R.J. Desnick, J. Politei, M. Mauer, A. Burlina, C. Eng, R.J. Hopkin, D. Laney, A. Linhart, S. Waldek, E. Wallace, F. Weidemann, W.R. Wilcox, Fabry disease revisited: management and treatment recommendations for adult patients, *Mol. Genet. Metab.* 123 (4) (2018) 416–427, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.02.014>.
- [12] M.A. Curiati, C.S. Aranda, S.O. Kyosen, P. Varela, V.G. Pereira, V. D'Almeida, J.B. Pesquero, A.M. Martins, The challenge of diagnosis and indication for treatment in Fabry disease, *JIEMS* 5 (2017) 1–7, <https://doi.org/10.1177/2326409816685735>.
- [13] B.W.J. Mol, C.T. Roberts, S. Thafaratinam, L.A. Magee, C.J.M. De Groot, J. Hofmeyr, Pre-eclampsia, *Lancet* 387 (10022) (2016) 999–1011, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00070-7).
- [14] A.L. Tranquilli, G. Gekker, L. Magee, J. Roberts, B.M. Sibai, W. Steyn, G.G. Zeeman, M.A. Brown, The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP, *Pregnancy Hypertens.* 4 (2) (2014) 97–104, <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2014.02.001>.
- [15] V.D. Garovic, S.J. Wagner, S.T. Turner, D.W. Rosenthal, W.J. Watson, B.C. Brost, *et al.*, Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196 (4) (2007), <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.02.007> 320.e1-320.e.7.
- [16] I. Furuta, T. Zhai, T. Umazume, S. Ishikawa, A. Hosokawa, T. Kojima, K. Chiba, T. Yamada, M. Morikawa, H. Minakami, Alteration of podocyte phenotype in the urine of women with preeclampsia, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 6 (2016), <https://doi.org/10.1038/srep24258> 24258.
- [17] Z. Armaly, J.E. Jadaon, A. Jabbour, Z.A. Abassi, Preeclampsia: novel mechanisms and potential therapeutic approaches, *Front. Physiol.* 9 (973) (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00973>.

- [18] J. Jamboti, C.H. Forrest, Fabry disease: early diagnosis improves prognosis but diagnosis is often delayed, *J. Nephropathol.* 6 (3) (2017) 130–133, <https://doi.org/10.15171/jnp.2017.22>.
- [19] J. Belinda, J.-L. Pascale, Q. Andi, D. Garry, S. Mian, T. Matos, C. Provenzano, A. Acharya, Podocyturia as a diagnostic marker for preeclampsia amongst high-risk pregnant patients, *J. Pregnancy* 2012 (2012), <https://doi.org/10.1155/2012/984630984630>.
- [20] H. Trimarchi, R. Canzonieri, A. Muryan, A. Schiel, A. Araoz, M. Forrester, Copious podocyturia without proteinuria and with normal renal function in a young adult with Fabry disease, *Case Rep. Nephrol.* 2015 (2015), <https://doi.org/10.1155/2015/257628257628>.
- [21] H. Trimarchi, Podocyturia: what is in a name? *J. Transl. Int. Med.* 3 (2) (2015) 51–56, <https://doi.org/10.1515/jtim-2015-0003>.
- [22] L.M. Craici, S.J. Wagner, K.R. Bailey, P.D. Fitz-Gibbon, C.M. Wood-Wentz, S.T. Turner, S.R. Hayman, W.M. White, B.C. Brost, C.H. Rose, J.P. Grande, V.D. Garovic, Podocyturia predate proteinuria and clinical features of preeclampsia: longitudinal prospective study, *Hypertension.* 61 (6) (2013) 1289–1296, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01115>.
- [23] B. Fall, C.R. Scott, M. Mauer, S. Shankland, J. Pippin, J.A. Jefferson, E. Wallace, D. Warnock, B. Najafian, Urinary podocyte loss is increased in patients with Fabry disease and correlates with clinical severity of Fabry nephropathy, *PLoS One* 11(12) (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168346>.
- [24] H. Trimarchi, R. Canzonieri, A. Schiel, J. Politei, A. Stern, J. Andrews, M. Paulero, T. Rengel, A. Aráoz, M. Forrester, F. Lombi, V. Pomeranz, R. Iriarte, P. Young, A. Muryan, E. Zotta, Podocyturia is significantly elevated in untreated vs treated Fabry adult patients, *J. Nephrol.* 29 (6) (2016) 791–797, <https://doi.org/10.1007/s40620-016-0271-z>.
- [25] H. Trimarchi, Podocyturia: potential applications and current limitation, *World J. Nephrol.* 6 (5) (2017) 221–228, <https://doi.org/10.5527/wjn.v6.i5.221>.

- [26] V.G. Puellas, J.F. Bertram, M.J. Moeller, Quantifying podocyte depletion: theoretical and practical considerations, *Cell Tissue Res.* 369 (2017) 229–236, <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2630-z>.
- [27] H. Hagmann, P.T. Brinkkoetter, Experimental models to study podocyte biology: stock-taking the toolbox of glomerular research, *Front. Pediatr.* 6 (193) (2018) 1–9, <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00193>.
- [28] T.P. Kelder, M.E. Penning, H.W. Uh, D. Cohen, K.W.L. Bloemenkamp, J.A. Bruijn, S.A. Scherjon, H.J. Baelde, Quantitative polymerase chain reaction-based analysis of podocyturia is a feasible diagnostic tool in preeclampsia, *Hypertension*. 60 (6)(2012) 1538–1544, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.2016881>.
- [29] I. Furuta, T. Zhai, T. Umazume, S. Ishikawa, A. Hosokawa, T. Kojima, K. Chiba, T. Yamada, M. Morikawa, H. Minakami, Post-partum podocyturia following pre-eclamptic pregnancy, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 43 (6) (2017) 1008–1013, <https://doi.org/10.1111/jog.13326>.
- [30] T. Maier, M. Güell, L. Serrano, Correlation of mRNA and protein in complex biological samples, *FEBS Lett.* 583 (24) (2009) 3966–3973, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>.
- [31] V.D. Garovic, L.M. Craici, S.J. Wagner, W.M. White, B.C. Brost, C.H. Rose, J.P. Grande, D.R. Barnidge, Mass spectrometry as a novel method for detection of podocyturia in pre-eclampsia, *Nephrol. Dial. Transplant.* 28 (6) (2013) 1555–1561, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs074>.
- [32] R. Simon, J. Lemoine, C. Fonbonne, A. Jaffuel, J.F. Léonard, J.C. Gauthier, O. Pasquier, A. Salvador, Absolute quantification of Podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring coupled mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 94 (2014) 84–91, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.019>.
- [33] J. Biarc, R. Simon, C. Fonbonne, J.F. Léonard, J.C. Gauthier, O. Pasquier, J. Lemoine, A. Salvador, Absolute quantification of podocalyxin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1397 (2015) 81–85, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.003>.

- [34] A.N. Kettenbach, J. Rush, S.A. Gerber, Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides, *Nat. Protoc.* 6 (2) (2013) 175–186, <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.196>.
- [35] K.B. Scott, I.V. Turko, K.W. Phinney, Quantitative performance of internal platforms for absolute protein quantification using multiple reaction monitoring-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (8) (2015) 4429–4435, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00331>.
- [36] C.M. Shuford, J.J. Walters, P.M. Holland, U. Screenivasan, N. Askari, K. Ray, R.P. Grant, Absolute protein quantification by mass spectrometry: not as simple as advertised, *Anal. Chem.* 89 (14) (2017) 7406–7415, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00858>.
- [37] V. Vidova, Z. Spacil, A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: targeted and data independent acquisition, *Anal. Chim. Acta* 964 (2017) 7–23, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.059>.
- [38] Canadian Fabry Disease Guideline 2018, The Garrod Association. <http://www.garrod.ca>, 2018 (accessed 04 December 2018).
- [39] J.S. Lin, K. Susztak, Podocytes: the weakest link in diabetic kidney disease? *Curr. Diab. Rep.* 16 (45) (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0735-5>.
- [40] V.G. Puelles, L.A. Cullen-McEwen, G.E. Taylor, J. Li, M.D. Hughson, P.G. Kerr, W.E. Hoy, J.F. Bertram, Human podocyte depletion in association with older age and hypertension, *Am. J. Phys. Renal Phys.* 310 (7) (2016) F656–F668, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00497.2015>.
- [41] D. Feig, H. Berger, L. Donovan, A. Godbout, T. Kader, E. Keely, R. Sanghera, Clinical practice guidelines: diabetes and pregnancy, *Can. J. Diabetes* 42 (2018) (2018) S255–S282, <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.10.038>.
- [42] S. Butalia, F. Audibert, A.M. Côté, T. Firoz, A.G. Logan, L.A. Magee, W. Mundle, E. Rey, D.M. Rabi, S.S. Daskalopoulou, K.A. Nerenberg, Hypertension Canada's 2018 guidelines for the management of hypertension in pregnancy, *Can. J. Cardiol.* 34 (5) (2018) 525–531, <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2018.02.021>.
- [43] C. Auray-Blais, D. Cyr, A. Ntwari, M.L. West, M.L. West, J. Cox-Brinkman, D.G. Bichet, D.P. Germain, R. Laframboise, S.B. Melançon, T. Stockley, J.T.R. Clarke, R.

- Drouin, Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease, *Mol. Genet. Metab. Rep.* 93(3) (2008) 331–340, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.10.001>.
- [44] C. Auray-Blais, C.M. Blais, U. Ramaswami, M. Boutin, D.P. Germain, S. Dyack, O. Bodamer, G. Pintos-Morell, J.T. Clarke, D.G. Bichet, D.G. Warnock, L. Echevarria, M.L. West, P. Lavoie, Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 438 (2014) 195–204, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.002>.
- [45] A. Beasley-Green, Urine proteomics in the era of mass spectrometry, *Int. Neurol.* J. 20 (Suppl. 2) (2016) S70–S75, <https://doi.org/10.5213/inj.1612720.360>.
- [46] L. Echevarria, K. Benistan, A. Toussaint, O. Dubourg, A.A. Hagege, D. Eladari, F. Jabbour, C. Beldjord, P. De Mazancourt, D.P. Germain, X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease, *Clin. Genet.* 89 (1) (2016) 44–54, <https://doi.org/10.1111/cge.12613>.
- [47] M. Arends, C. Wanner, D. Hughes, A. Mehta, D. Oder, O.T. Watkinson, P.M. Elliott, G.E. Linthorst, F.A. Wijburg, M. Biegstraaten, C.E. Hollak, Characterization of classical and nonclassical Fabry disease: a multicenter study, *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (5) (2017) 1631–1641, <https://doi.org/10.1681/ASN.2016090964>.
- [48] S.I. Gilani, U.D. Anderson, M. Jayachandran, T.L. Weissgerber, L. Zand, W.M. White, N. Milic, M.L.G. Suarez, R.R. Vallapureddy, Å. Nää, L. Erlandsson, J.C. Lieske, J.P. Grande, K.A. Nath, S.R. Hansson, V.D. Garovic, Urinary extra-cellular vesicles of podocytes origin and renal injury in preeclampsia, *J. Am. Soc. Nephrol.* 28 (11) (2017) 3363–3372, <https://doi.org/10.1681/ASN.2016111202>.

APPENDIX A - SUPPLEMENTARY MATERIAL

Tandem mass spectrometry analysis of urinary podocalyxin and podocin in the investigation of podocyturia in women with preeclampsia and Fabry disease patients

Tristan Martineau^a, Michel Boutin^a, Anne-Marie Côté^b, Bruno Maranda^a, Daniel Bichet^c and Christiane Auray-Blais^{a*}

^aDivision of Medical Genetics, Department of Pediatrics, ^bDivision of Nephrology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Centre de recherche-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4

^cSacré-Coeur Hospital, Université de Montréal, Quebec, Canada

* Email: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca; FAX: +1-819-564-5217.

Figure S-1. Major coelution peptide from HSA protein detected after cumulating MS scan signals 30 sec before and after the retention time of the podocin target peptide APAATVVDVDEVR (10.82 min) in a treated Fabry male patient having 1.09 mg/mL total urinary proteins.

Figure S-2. Major coelution peptides from HSA protein detected after cumulating MS scan signals 30 sec before and after the retention time of the podocalyxin target peptide ATFNPAQDK (5.84 min) in a treated Fabry male patient having 1.09 mg/mL total urinary proteins.

Table S-1. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) and intra- and interday precision and accuracy assays for low (L), medium (M), and high (H) spiked urine quality controls (U-QC) and spiked synthetic urine quality controls (S-QC) using the cleavable peptide standards for ATFNPAQDK and APAATVVDVDEVR for podocalyxin and podocin, respectively.

Table S-2. Overall recovery assays (%) for ATFNPAQDK and APAATVVDVDEVR peptides for podocalyxin and podocin, respectively, in urine spiked with cleavable peptide standards before the extraction, and initial sequence after

extraction. Biases for plastic adsorption after 5 transfers in plasticware is also shown with low (L) and high (H) spiked urine quality controls (U-QCs).

Table S-3. Stability of ATFNPAQDK and APAATVVDVDEVVR peptides for podocalyxin and podocin, respectively, in urine spiked quality controls (U-QCs) at low (L) and high (H) concentration levels at 22°C, 4°C, -20°C, -80°C, after 5 freeze-thaw cycles, and for extracted samples after 48 hours in the UPLC autosampler at 20°C.

Table S-4. Comparison of the results obtained for podocalyxin, podocin, proteinuria, albuminuria, total Gb₃ and lyso-Gb₃ levels in urine between controls and patients using the non-parametric Mann Whitney-U test (*p*-values) and areas under the ROC curve. Data in brackets represent the minimum and maximum values for AUC.

Table S-5. Male and female Fabry patients (n=29) according to gender, treatment and mutation types.

Protocol S-1. Methodology and Parameters for the Analysis of Recombinant Podocin on a UPLC-Xevo TQ-S system

Protocol S-2. Methodology and Parameters for the Analysis of Recombinant Podocalyxin on a UPLC-Xevo TQ-S system

Protocol S-3. Methodology and Parameters for the analysis of HSA peptides on a UPLC-Q-TOF system

Figure S-1.

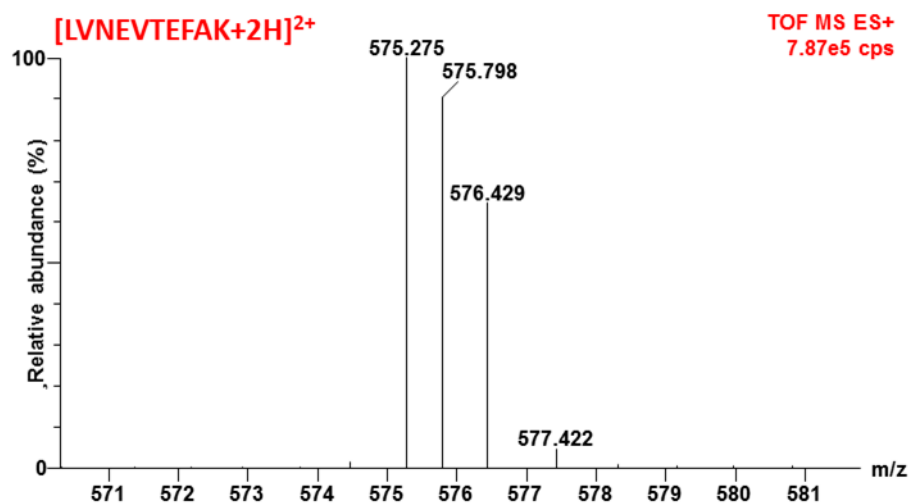


Figure S-2.

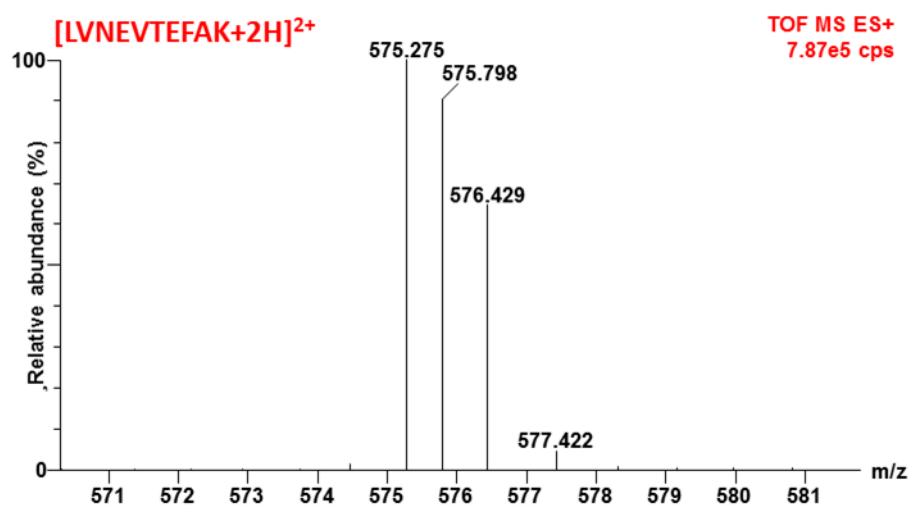


Table S-1.

	LOD (n=5)	LOQ (n=5)	Precision (RSD %) (n=5)						Accuracy (Bias%) (n=5)					
	pM	pM	U-LQC	U-MQC	U-HQC	U-LQC	U-MQC	U-HQC	S-LQC	S-MQC	S-HQC	S-LQC	S-MQC	S-HQC
ATFNPAQDK (Podocalyxin)	17.1	56.9	4.5	6.5	2.7	2.2	2.6	3.1	17.1	9.2	14.1	10.2	3.1	7.0
APAATVVDVDEV (Podocin)	19.0	63.3	5.1	5.4	2.4	6.2	4.9	4.5	18.1	13.8	18.9	8.2	3.8	8.6

Table S-2.

	Overall Recovery (%)		Plastic Adsorption (Bias%)	
	n=5		5 transfers (n=3)	
	U-LQC	U-HQC	U-LQC	U-HQC
ATFNPAQDK (Podocalyxin)	65.2	69.8	1.2	-0.2
APAATVVDVDEV (Podocin)	72.9	81.2	-2.5	-1.5

Table S-3.

		Stability (Bias%)																					
		22°C (n=3)		Autosampler 20°C (n=3)				4°C (n=3)				-20°C (n=3)				-80°C (n=3)				Freeze Thaw (n=5)			
		24 h		24 h		48 h		24 h		48 h		1 week		1 week		2 weeks		1 week		2 weeks		5 cycles	
		L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H	L	H
ATFNPAQDK (Podocalyxin)		-8.8	-15.5	0.4	-1.0	0.7	-0.8	-7.9	-12.6	-0.8	-10.2	-0.8	-8.6	2.3	-4.1	-2.4	-5.7	5.9	-2.3	-4.6	-3.5	-0.8	-3.5
APAATVVVDVDEV (Podocin)		-12.8	-12.6	-6.0	-0.7	-2.9	-1.2	-20.0	-13.8	-12.6	-10.1	-11.0	-13.1	-10.7	-7.7	-2.1	-9.1	-3.5	-6.3	-11.8	-6.2	4.1	-2.1

Table S-4.

	Podocalyxin (p-value / AUC)	Podocin (p-value / AUC)	Proteinuria (p-value / AUC)	Albuminuria (p-value / AUC)	Total Gb _s (p-value / AUC)	Urinary Lyso-Gb _s (p-value / AUC)
Fabry Groups						
CM vs TFM	0.057 / 0.75 (0.52-0.97)	0.019 / 0.79 (0.59-1.00)*	0.078 / 0.73 (0.50-0.96)	0.011 / 0.83 (0.65-1.00)*	0.002 / 0.90 (0.76-1.00)*	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*
CM vs UFM	0.197 / 0.80 (0.47-1.00)	0.039 / 0.95 (0.82-1.00)*	0.032 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.032 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.032 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.032 / 1.00 (1.00-1.00)*
CM vs CF	0.041 / 0.77 (0.55-0.99)*	1.000 / 0.50 (0.24-0.76)	0.241 / 0.66 (0.41-0.90)	0.406 / 0.61 (0.36-0.87)	0.406 / 0.61 (0.35-0.87)	1.000 / 0.50 (0.24-0.76)
CF vs TFF	0.129 / 0.73 (0.45-1.00)	0.473 / 0.60 (0.29-0.91)	0.193 / 0.70 (0.41-0.99)	0.083 / 0.77 (0.47-1.00)	0.051 / 0.80 (0.58-1.00)	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*
CF vs UFF	0.016 / 0.82 (0.63-1.00)*	0.048 / 0.75 (0.52-0.98)*	0.571 / 0.58 (0.31-0.84)	0.023 / 0.80 (0.60-1.00)	0.005 / 0.87 (0.71-1.00)*	0.001 / 0.90 (0.74-1.00)*
	Podocalyxin (p-value / AUC)	Podocin (p-value / AUC)	Proteinuria (p-value / AUC)	Albuminuria (p-value / AUC)	DBP (p-value / AUC)	SBP (p-value / AUC)
Preeclampsia Groups						
CF vs NP	0.000 / 0.97 (0.91-1.00)*	0.016 / 0.78 (0.60-0.97)*	0.598 / 0.44 (0.60-0.97)	0.437 / 0.41 (0.16-0.65)	n/a	n/a
CF vs GD	0.001 / 0.97 (0.90-1.00)*	0.002 / 0.92 (0.80-1.00)*	0.347 / 0.37 (0.10-0.64)	0.595 / 0.43 (0.16-0.70)	n/a	n/a
CF vs HP	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.005 / 0.89 (0.71-1.00)*	0.790 / 0.46 (0.18-0.75)	0.183 / 0.69 (0.43-0.95)	n/a	n/a
CF vs PE	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.009 / 0.82 (0.66-0.99)*	0.000 / 0.99 (0.97-1.00)*	n/a	n/a
NP vs GD	0.612 / 0.56 (0.29-0.83)	0.100 / 0.70 (0.47-0.94)	0.421 / 0.40 (0.16-0.64)	0.591 / 0.57 (0.33-0.80)	0.811 / 0.47 (0.19-0.76)	0.170 / 0.33 (0.09-0.57)
NP vs HP	0.005 / 0.87 (0.71-1.00)*	0.270 / 0.64 (0.39-0.90)	0.949 / 0.49 (0.24-0.75)	0.138 / 0.69 (0.43-0.95)	0.000 / 0.99 (0.97-1.00)*	0.004 / 0.87 (0.71-1.00)*
NP vs PE	0.000 / 0.95 (0.86-1.00)*	0.000 / 0.96 (0.90-1.00)*	0.000 / 0.89 (0.77-1.00)*	0.000 / 0.98 (0.94-1.00)*	0.000 / 0.98 (0.94-1.00)*	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*
GD vs HP	0.068 / 0.76 (0.54-0.99)	0.630 / 0.43 (0.15-0.72)	0.441 / 0.61 (0.33-0.89)	0.124 / 0.72 (0.45-1.00)	0.011 / 0.86 (0.68-1.00)*	0.005 / 0.90 (0.75-1.00)*
GD vs PE	0.000 / 0.95 (0.86-1.00)*	0.007 / 0.85 (0.69-1.00)*	0.001 / 0.92 (0.79-1.00)*	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*	0.000 / 0.95 (0.86-1.00)*	0.000 / 1.00 (1.00-1.00)*
HP vs PE	0.009 / 0.85 (0.67-1.00)*	0.007 / 0.86 (0.67-1.00)*	0.006 / 0.87 (0.71-1.00)*	0.003 / 0.62 (0.35-0.89)*	0.381 / 0.62 (0.35-0.89)	0.004 / 0.88 (0.71-1.00)*

NP: women with normotensive pregnancies; GD: women with gestational diabetes; HP: women with hypertensive pregnancies; PE: women with preeclampsia; DBP: diastolic blood pressure; SBP: systolic blood pressure; n/a: not available; *p-value<0.05 and AUC>0.50

Table S-5.

Mutation descriptions						
Mutation Types	Exon	Nucleotide Modification	Amino Acid Modification	Gender	ERT	Number of patients
Missense	7	C.1042G>C	p.Ala348Pro	F	YES	2
				F	NO	3
				M	YES	4
				M	NO	1
	7	C.1241T>C	p.Leu414Ser	F	YES	1
				M	YES	1
	2	C.242G>C	p.Trp81Ser	F	YES	1
	1	C.2T>C	p.Met1Thr	M	YES	1
	4	C.612G>A	p.Trp204Ter	M	YES	2
	6	C.877C>A	p.Pro293Thr	F	NO	1
Deletion	6	C.950T>C	p.Ile317Thr	M	YES	1
	6	C.961C>G	p.Gln321Glu	F	NO	2
	2	C.17-327del	---	M	NO	1
	1	C.35_47del13	p.Cys12PhefsTer105	M	YES	1
Concensus Splice Mutation	4	C.559_560delAT	p.Met187Valfs*6	F	NO	1
	5	C.761_763delTTG	p.Val254del	F	NO	2
Frameshift	4	C.540-2A>C (IVS4-2A>C)	---	F	YES	1
Frameshift	1	C.102T>G	p.Asn34Lysfs*22	F	YES	1
n/a	n/a	n/a	n/a	F	NO	1
n/a	n/a	n/a	n/a	M	YES	1

n/a: not available; ERT: Enzyme replacement therapy; M: Males; F: Females.

Protocol S-1. Methodology and Parameters for the Analysis of Recombinant Podocin on a UPLC-Xevo TQ-S system

0.1 µg/µL of recombinant podocin was prepared in 90 µL of 50 mM NH_4HCO_3 , and treated 30 min at 37°C with 2.5 µL of DTT 45 mM. Cysteine residues were alkylated by adding 2.5 µL 100 mM iodoacetamide and incubating the preparation for 20 min in darkness at room temperature (23°C). The enzymatic digestion was performed with 0.15 µg porcine trypsin IX-S and incubated 16 h at 37°C with orbital shaking (225 rpm). The trypsin digestion was quenched by adding 2.5 µL of 4%(v/v) F.A. and injected on the Acquity I-Class UPLC system with a linear gradient reversed-phase UPLC method on a BEH C18 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm (Waters Corp.) at 30°C. The UPLC system was coupled to a Xevo TQ-S mass spectrometer working in positive electrospray ionization (ESI+) using the multiple reaction monitoring (MRM) mode.

UPLC Main Parameters: Injection volume: 5 µL; Flow rate: 0.3 mL/min; phase A: 100% ACN + 0.2 % F.A.; phase B: 95% H_2O /5% ACN + 0.2% F.A. Chromatographic method: 0→2min (100% phase B, isocratic gradient); 2→6 min (70% phase B, linear gradient); 6→8 min (100% phase A, isocratic gradient) and 8→12 min (100% phase B, isocratic gradient).

Podocin MRM transitions selected (produced by Skyline software):

Podocin Peptides	APAATVVDVDEVR	MAAEILSGTPAAVQLR	QEAGPEPSGSGR
Precursor Ions	671,3541++	814,4454++	586,2705++
Fragment Ions (y-ions)	P [y ₁₂] - 1270,6638+	A [y ₁₅] - 1496,8431+	E [y ₁₁] - 1043,4752+
	A [y ₁₁] - 1173,6110+	A [y ₁₄] - 1425,8060+	A [y ₁₀] - 914,4326+
	A [y ₁₀] - 1102,5739+	E [y ₁₃] - 1354,7689+	G [y ₉] - 843,3955+
	T [y ₉] - 1031,5368+	I [y ₁₂] - 1225,7263+	P [y ₈] - 786,3741+
	V [y ₈] - 930,4891+	L [y ₁₁] - 1112,6422+	E [y ₇] - 689,3213+
	V [y ₇] - 831,4207+	S [y ₁₀] - 999,5582+	P [y ₆] - 560,2787+
	D [y ₆] - 732,3523+	G [y ₉] - 912,5261+	S [y ₅] - 463,2259+
	V [y ₅] - 617,3253+	T [y ₈] - 855,5047+	G [y ₄] - 376,1939+
	D [y ₄] - 518,2569+	P [y ₇] - 754,4570+	S [y ₃] - 319,1724+
	E [y ₃] - 403,2300+	A [y ₆] - 657,4042+	G [y ₂] - 232,1404+
	V [y ₂] - 274,1874+	A [y ₅] - 586,3671+	R [y ₁] - 175,1190+
	R [y ₁] - 175,1190+	V [y ₄] - 515,3300+	
		Q [y ₃] - 416,2616+	
		L [y ₂] - 288,2030+	
		R [y ₁] - 175,1190+	

MS/MS Main Parameters:

Desolvation temperature	425°C
Cone Gas Flow	200 L/h
Desolvation Gas Flow	775 L/h
Collision Gas Flow	0.15 mL/min
Nebuliser Gas Flow	5.00 Bar
Capillary Voltage	2.0 kV
Cone Voltage	50 V
MS/MS Collision Energy	23 V

Protocol S-2. Methodology and Parameters for the Analysis of Recombinant Podocalyxin on a UPLC-Xevo TQ-S system

2.5 µg of recombinant podocalyxin in 1 mL was treated with 100 µL of 7 mg/mL DOC prepared in 500 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$, 100 µL 150 mM DTT prepared in 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$, and incubated 40 min at 60°C. Cysteine residues were alkylated by adding 250 µL of 150mM iodoacetamide prepared in 50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$ and incubating for 40 min in darkness at room temperature (23°C). The enzymatic digestion was performed with 50 µg porcine trypsin IX-S and incubated 16 h at 37°C with orbital shaking (225 rpm). The trypsin digestion was quenched by adding 30 µL of 25% (v/v) F.A. The sample was loaded on a solid phase extraction OASIS MCX cartridge (3 cc, 60 mg) previously conditioned with 1 mL MeOH and 1 mL H_2O containing 0.5% F.A. Cartridges were washed consecutively with 1 mL 70:30 H_2O :MeOH containing 0.5% F.A., 1 mL H_2O containing 0.5% F.A., 1 mL 200 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$, and eluted in a 5 mL polypropylene tube with 1 mL 80:20 (30mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3^-$:MeOH). The extracted sample was evaporated for 2 h at 55°C with a SpeedVac SPD131DDA from ThermoFisher Scientific (Waltham, USA) at 1 Torr and reconstitution in 100 µL H_2O containing 0.5% F.A. The sample was extracted and injected on the Acquity I-Class UPLC system with a linear gradient reversed-phase UPLC method on a CSH C18 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm (Waters Corp.) at 30°C. The UPLC system was coupled to a Xevo TQ-S mass spectrometer working in positive electrospray ionization (ESI+) using the multiple reaction monitoring (MRM) mode.

UPLC Main Parameters: Injection volume: 10 µL; Flow rate: 0.4 mL/min; phase A: 100% ACN + 0.2 % F.A.; phase B: 95% H_2O /5% ACN + 0.2% F.A. Chromatographic method: 0→1min (100% phase B, isocratic gradient); 1→12min (90% phase B, linear gradient); 12→14min (100% phase A, isocratic gradient) and 14→17 min (100% phase B, isocratic gradient).

Podocalyxin MRM transitions selected (produced by Skyline software):

Podocalyxin Peptides	ATFNPAQDK	ANEILASVK	LASVPGSQTVVVK
Precursor Ions	496,2458++	472,7742++	642,8797++
Fragment Ions (y-ions)	T [y ₈] - 920,4472+	N [y ₈] - 873,5040+	A [y ₁₂] - 1171,6681+
	F [y ₇] - 819,3995+	E [y ₇] - 759,4611+	S [y ₁₁] - 1100,6310+
	N [y ₆] - 672,3311+	I [y ₆] - 630,4185+	V [y ₁₀] - 1013,5990+
	P [y ₅] - 558,2882+	L [y ₅] - 517,3344+	P [y ₉] - 914,5306+
	A [y ₄] - 461,2354+	A [y ₄] - 404,2504+	G [y ₈] - 817,4778+
	Q [y ₃] - 390,1983+	S [y ₃] - 333,2132+	S [y ₇] - 760,4563+
	D [y ₂] - 262,1397+	V [y ₂] - 246,1812+	Q [y ₆] - 673,4243+
	K [y ₁] - 147,1128+	K [y ₁] - 147,1128+	T [y ₅] - 545,3657+
			V [y ₄] - 444,3180+
			V [y ₃] - 345,2496+
			V [y ₂] - 246,1812+
			K [y ₁] - 147,1128+

MS/MS Main Parameters:

Desolvation temperature	200°C
Cone Gas Flow	150 L/h
Desolvation Gaz Flow	800 L/h
Collision Gas Flow	0.15 mL/min
Nebuliser Gas Flow	7.00 Bar
Capillary Voltage	2.4 kV
Cone Voltage	13 V
MS/MS Collision Energy	20 V

Protocol S-3. Methodology and Parameters for the analysis of HSA peptides on a UPLC-Q-TOF system

A urine sample from a treated Fabry male patient having 1.05 mg/mL total urinary proteins (used for the matrix effect evaluation) was compared with a healthy male control urine specimen having 18.6 mM creatinine. Urine samples were prepared as described previously and injected on an Acquity H-Class UPLC system with a linear gradient reversed-phase UPLC method on a Cortecs T3 1.7 μ m, 2.1 mm x 100 mm (Waters Corp.) at 35°C. The UPLC system was coupled to a Synapt G1 (Waters Corp.) time of flight mass spectrometer working in positive electrospray ionization (ESI+) in V mode using the MS scan ranging from 50 to 1000 m/z . Results obtained represent the peptide detected only in the treated Fabry male patient.

UPLC Parameters: Injection volume: 7.5 μ L; Flow rate: 0.6 mL/min; phase A: 100% ACN + 0.1 % F.A.; phase B: 100% H₂O + 0.1% F.A. Chromatographic method: 0→3min (95% phase B, isocratic gradient); 3→12min (83% phase B, linear gradient); 12→14min (100% phase A, linear gradient); 14→16min (100% phase A, isocratic gradient) and 16→18 min (95% phase B, linear gradient) and 18→20min (95% phase B, isocratic gradient).

Synapt G1 Q-TOF Main Parameters

Desolvatation Temperature	500°C
Cone Gas Flow	30 L/h
Desolvation Gaz Flow	1000 L/h
Trap Collision Energy	6.0 V
Trap Gas Flow	1.30 mL/min
Transfer Collision Energy	4.0 V
Capillary Voltage	3.0 kV
Cone Voltage	30 V

DISCUSSION

La spectrométrie de masse est un outil analytique de prédilection pour le domaine de la santé basé sur le rapport masse sur charge des ions de molécules permettant, entre autres, la découverte, l'élucidation de structures, l'établissement de masses exactes et la quantification de biomarqueurs dans les matrices biologiques. En fait, la grande sensibilité offerte par la spectrométrie de masse permet de détecter et de caractériser les molécules même à de très faibles concentrations. Un diagnostic plus précis est alors rendu possible pour les personnes atteintes d'une maladie génétique et non génétique. Par ailleurs, cet outil est peu utilisé pour le diagnostic de problèmes rénaux.

Présentement, le diagnostic des dommages rénaux est évalué selon une échelle de risque basée sur la sévérité de la protéinurie et de la réduction du DFG. Malgré une bonne efficacité pour diagnostiquer les patients atteints de problèmes rénaux chroniques, ces outils distinguent difficilement les patients asymptomatiques qui sont à risque de développer des problèmes rénaux. Ces limitations aux tests couramment utilisés suscitent un grand intérêt scientifique afin de développer des outils alternatifs pour évaluer rapidement les problèmes rénaux chez les patients. Grâce aux avancements technologiques, il a été démontré que le détachement abondant et soutenu des podocytes des glomérules était un signe de dommages rénaux. De plus, il a été avancé que ce détachement podocytaire semblait être révélateur avant même la présence de protéinurie et la réduction du DFG chez certains patients. Ceci a donc mené au développement de nombreuses méthodes analytiques de la podocyture basées sur le marquage cellulaire, la quantification d'ARNm spécifiques et la quantification de protéines podocytaires par spectrométrie de masse. Toutefois, la faible sensibilité, ainsi que la grande variabilité au niveau des résultats obtenus par ces méthodes, souvent occasionnée par la matrice elle-même et sa préparation, ont limité leur application.

En nous inspirant de méthodes rapportées dans la littérature, nous voulions pallier à ces limitations et tenter de développer une méthode robuste pour évaluer la podocyture. L'objectif principal du projet était de développer une nouvelle méthode permettant l'analyse simultanée de protéines podocytaires, la podocalyxine et la podocine, par spectrométrie de

masse en utilisant des peptides standards clivables. L'utilité de ces standards était de réduire la variabilité causée par la matrice urinaire. Par ailleurs, ces peptides n'avaient pas la même conformation spatiale que les protéines d'intérêt, mais c'était une option privilégiée pour réduire la variabilité analytique, tout en maintenant le coût relié à la production de standard protéique à un niveau acceptable (Shufort *et al.*, 2017).

La première étape fut de se procurer des protéines recombinantes afin de déterminer les peptides qui seraient utilisés comme standards. Ce choix était important, puisque nous n'avions pas d'échantillons d'urine frais, riches en protéines podocytaires qui étaient disponibles. Nous avons donc évalué le profil peptidique produit suite à la digestion des protéines podocytaires. Nous avons ensuite sélectionné les séquences peptidiques donnant le meilleur signal sur le spectromètre de masse. Parmi les peptides retenus, nous avons sélectionné la séquence qui étaient moins à risque de former des modifications post-traductionnelles et ce, selon les acides aminés formant la séquence. Ainsi, nous avons sélectionné la séquence APAATVVDVDEVR pour quantifier la podocine et ATFNPAQDK pour la podocalyxine. Nous avons fait synthétiser les mêmes séquences avec des amorces de 5 acides aminés à chaque extrémité afin de créer une séquence clivable. Ces amorces sont identiques aux acides aminés de la séquence originale de la protéine analysée. Puis, nous avons optimisé les paramètres du spectromètre de masse afin d'obtenir le meilleur signal reproductible pour chaque peptide analysé. De plus, une méthode MRM a été développée pour assurer un maximum de spécificité.

À la suite de ces développements, les standards synthétisés ont été utilisés pour optimiser chaque étape de la préparation de l'échantillon. Un traitement préalable à la digestion enzymatique a permis de dénaturer et rendre linéaire les protéines analysées. Cette étape a permis d'optimiser la digestion enzymatique en facilitant l'accès de l'enzyme aux sites de clivages sur les protéines. D'autre part, nous avons ajouté un excès de trypsine dans les échantillons lors de la digestion pour uniformiser celle-ci et ce, considérant que la concentration en albumine sérique humaine est variable d'un patient à l'autre. Par la suite, nous avons ajouté une étape de purification après la digestion pour éliminer le plus possible des substances interférentes provenant de la matrice qui pourraient supprimer le signal sur le

spectromètre de masse. Nous avons ensuite ajouté une étape de centrifugation pour concentrer les échantillons (facteur de 10X) afin d'augmenter la détection des molécules d'intérêt. Cette étape a été cruciale pour détecter le peptide de la podocine qui était en plus faible concentration que celui de la podocalyxine.

Une fois la méthode de la préparation de l'échantillon optimisée, nous avons dû ajuster la chromatographie liquide et évaluer la variation causée par l'effet de matrice. Ces optimisations ont mené à une suppression ionique maximale de 40 % du fait que le gradient de la chromatographie liquide a été ajusté pour que les interférents principaux ne coéluent pas en même temps que nos peptides d'intérêt. Considérant que la suppression ionique était toujours présente, nous avons opté pour l'utilisation d'un standard de peptide interne lourd et clivable pour chaque peptide d'intérêt afin de compenser au maximum l'effet de matrice. L'avantage des standards internes réside dans le fait que ce sont des molécules ayant les mêmes propriétés physico-chimiques qui se comportent comme les molécules d'intérêt, mais avec une masse différente (donc distincts). Nous obtenons donc une réponse pouvant être comparée à une courbe de calibration et établir les concentrations molaires des peptides/protéines lors de l'analyse.

Finalement, nous avons effectué la validation de la méthode en validant une courbe de quantification basée sur des standards clivables et procédé à des tests de précision et d'exactitude intrajour et interjours. De plus, des tests de stabilité à différentes périodes de temps et différentes températures ont été effectués. Les analyses ont démontré que les résultats étaient reproductibles et que les peptides étaient plus stables à -30°C et à -80°C. Aussi, les résultats montrent que les standards peptidiques clivables sont stables et permettent une bonne quantification des protéines.

Les objectifs secondaires du projet consistaient: 1) à doser la podocine et la podocalyxine dans une cohorte de patients atteints de la maladie de Fabry, de la prééclampsie et de les comparer à des contrôles; 2) à évaluer le potentiel des deux protéines comme biomarqueurs de la podocyurie; et 3) à évaluer les corrélations des deux protéines avec des paramètres cliniques. Tout d'abord, nous avons recruté spécifiquement des profils de patients divisés en

deux groupes: un pour la maladie de Fabry et un pour la prééclampsie. Le groupe Fabry regroupait des patients des deux sexes sans ou avec traitement avec la TER et leurs contrôles. Le groupe de la prééclampsie regroupait des femmes non enceintes en santé, des femmes enceintes sans complication et des femmes atteintes de diabète gestationnel, d'hypertension gestationnelle ou de prééclampsie. Les femmes atteintes de diabète gestationnel ou d'hypertension gestationnelle étaient considérées comme des contrôles pathologiques, pouvant aussi avoir des dommages rénaux.

Les résultats au niveau du groupe Fabry ont montré que la concentration endogène de la podocalyxine était nettement supérieure à celle de la podocine dans l'ensemble des échantillons. Aussi, au niveau des contrôles, le niveau de podocalyxine était significativement plus élevé chez les femmes que chez les hommes. Nous avons donc séparé la cohorte selon le genre pour cette étude. En comparant les contrôles avec les patients Fabry, les niveaux des deux protéines à l'étude étaient variables, mais restaient significativement plus élevés chez les patients comparativement aux contrôles. De plus, en utilisant les valeurs de références établies, nous avons noté que la spécificité était élevée, mais la sensibilité était faible. Néanmoins, ces résultats peuvent être explicables par le faible échantillonnage à l'étude et le nombre important de mutations retrouvées au sein des patients Fabry. Toutefois, la podocine semble plus révélatrice chez les hommes atteints de la maladie de Fabry et la podocalyxine semble plus probante chez les femmes Fabry. En comparant les concentrations avec certains paramètres biochimiques des patients, le niveau de protéines podocytaires corrèle positivement avec le lyso-Gb₃ urinaire et le niveau de podocalyxine corrèle positivement avec le Gb₃ urinaire. Une étude avec un plus grand nombre de patients permettrait de mieux évaluer si la podocine et la podocalyxine seraient de bons biomarqueurs chez ces patients.

Les comparaisons entre les groupes au niveau de la prééclampsie montrent que le niveau de protéines podocytaires était nettement supérieur chez les femmes enceintes comparativement aux femmes non enceintes et ce, grâce aux valeurs de références établies à partir des femmes enceintes sans complication. En comparant les contrôles sains, les contrôles pathologiques et les femmes prééclampsiques, il fut observé que le niveau de protéines podocytaires était plus

élevé chez les femmes hypertensives et les femmes prééclampsiques. De plus, en comparant les valeurs de références à celles des patientes prééclampsiques, la podocine et la podocalyxine offrent une meilleure sensibilité comparativement aux autres groupes. Toutefois, l'étendue des valeurs des protéines urinaires était grande au sein des patientes prééclampsiques. Il aurait été intéressant de cibler le moment approprié pour effectuer l'analyse podocytaire, car les volontaires ont été recrutés à différents moments de leur grossesse et il est possible que la sévérité ait pu varier selon le moment diagnostiqué. Des corrélations ont été observées entre les protéines podocytaires et les paramètres habituellement utilisés pour diagnostiquer la prééclampsie. La concentration des protéines podocytaires corrélait positivement avec la protéinurie, l'albuminurie, la pression artérielle systolique et diastolique. De plus, ladite concentration corrélait avec la diminution de la durée de la gestation chez les femmes prééclampsiques.

CONCLUSIONS

Nous avons pu respecter les objectifs de cette étude en développant et en validant une méthode d'analyse quantitative simultanée en UPLC-MS/MS de la podocalyxine et de la podocine par spectrométrie de masse en tandem à l'aide de standards peptidiques clivables et en procédant à leur dosage chez les patients et les contrôles afin d'établir des corrélations. La fiabilité et la robustesse de ladite méthode relèvent du fait que chaque étape de préparation des échantillons et de l'analyse par spectrométrie de masse a été évaluée et optimisée. De plus, deux avantages majeurs de cette méthode est que seulement 1 mL de surnageant urinaire est nécessaire pour l'analyse et le temps de préparation de 10 heures est considérablement réduit comparé aux méthodes précédemment développées qui nécessitaient au moins 2 jours. Cette méthode en spectrométrie de masse pourrait être utile comme outil d'investigation et alternative pour une évaluation précoce de patients à risque d'avoir des problèmes rénaux.

En terme de perspectives futures, nous croyons que des comparaisons analytiques sur les mêmes échantillons entre cette méthode en spectrométrie de masse et d'autres méthodes en vigueur pourraient être révélatrices. Citons en exemple, la mesure de la quantité de podocytes ou ARN messagers dans l'urine versus la concentration de protéines podocytaires dans le surnageant d'urine. La méthode développée en spectrométrie de masse pourrait également être utilisée lors d'études longitudinales pour étudier l'évolution de la podocyturie dans le temps en lien avec l'apparition de la protéinurie. Aussi, l'ajout de d'autres protéines à ladite méthode pourrait permettre un profil personnalisé des protéines podocytaires chez un patient où il y a suspicion de troubles rénaux, facilitant ainsi la confirmation d'un diagnostic. La méthode pourrait aussi être adaptée pour offrir un dépistage à haut risque à partir de l'urine prélevée sur papier filtre.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Christiane Auray-Blais pour m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire de spectrométrie de masse. Sans cette chance, je n'aurais sûrement pas pu maîtriser cette technologie. Grâce à elle, j'ai pu découvrir un volet de la science que je ne connaissais pas. Merci de m'avoir soutenu, d'avoir pris le temps de m'aider. Merci aussi pour m'avoir aidé à devenir plus rigoureux en science et à m'épanouir durant toutes ces années.

Je tiens à remercier personnellement mon épouse, Stéphanie Pouliot, pour son soutien, ses conseils, son écoute et son amour. Tu as été essentielle pour m'aider à me dépasser.

Je tiens à remercier Michel Boutin, puisqu'il m'a aidé à mieux comprendre la complexité des défis de ce projet. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter et de me conseiller sur l'approche à avoir avec ces protéines et d'avoir pris le temps de réviser mes travaux et de m'avoir aidé à être plus précis. Merci pour ta patience et ton soutien.

Merci à Dr Maranda, Dr Bichet et Dre Côté, ainsi qu'à tout le personnel au recrutement des patients pour leur temps et leur collaboration dans le cadre de ce projet.

Merci aux patients et aux contrôles sains pour leur temps et leur participation au projet.

Merci à Dr Joe T.R. Clarke et à Dr Darel Hunting d'avoir accepté d'être membres du jury de mon mémoire.

Merci à toute l'équipe du service de génétique et du département de médecine nucléaire et de radiobiologie.

Finalement, merci à la Fondation des étoiles d'avoir soutenu le projet et à Waters Corp. pour leur soutien technique.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A.L., Chou, D., et Say, L. (2013) Global and Regional Estimates of Preeclampsia and Eclampsia: a Systematic Review. *Eur. J. Obstet. Reprod. Biol.* 170(1): 1-7.
- Abalos, E., Cuesta, C., Carroli, G., Qureshi, Z., Widmer, M., Vogel, J.P., et Souza, J.P. (2014) Pre-eclampsia, Eclampsia and Adverse Maternal and Perinatal Outcomes: a Secondary Analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG*. 121(suppl 1): 14-24.
- Abaoui, M., Boutin, M., Lavoie, P., et Auray-Blais, C. (2016) Tandem mass spectrometry multiplexe analysis of methylated and non-methylated urinary Gb₃ isoforms in Fabry Disease patients. *Clin. Chim. Acta* 452: 191-198.
- Aita, K., Etoh, M., Hamada, H., Yokoyama, C., Takahashi, A., Suzuki, T., Hara, M., et Nagata, M. (2009) Acute and Transient Podocyte Loss and Proteinuria in Preeclampsia. *Nephron Clin. Pract.* 112: c65–70.
- Alberta Health Services (2017) Gene therapy used to treat Fabry disease – a world first, <https://www.albertahealthservices.ca/news/releases/2017/Page13691.aspx> (page consultée le 14 décembre 2017)
- Al Hussain, T., Al Mana, H., Hussein, M.H., et Akhtar, M. (2017) Podocytes and Parietal Epithelial Cell Interactions in Health and Disease. *Adv. Anat. Pathol.* 24(1): 24-34.
- Allen, R., Rogozinska, E., Sivarajasingam, P., Khan, K.S., et Thangaratinam, S. (2014) Effect of Diet- and Lifestyle-based Metabolic Risk-modifying Interventions on Preeclampsia: a Meta-analysis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 93(10): 973-985.
- American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) (2013) Hypertension in Pregnancy: Executive Summary. *Obstet. Gynecol.* 122(5): 1122-1131.
- Angel, P.M., et Orlando, R. (2007) Quantitative Carbamylation as a Stable Isotopic Labeling Method for Comparative Proteomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21(10): 1623-1634.
- Arends, M., Hollak, C.E.M., et Biegstraaten M. (2015) Quality of Life in Patients with Fabry Disease: a Systematic Review of the Literature. *Orphanet J. Rare Dis.* 10: 77.
- Arends, M., Körver, S., Hughes, D.A., Mehta, A., Hollak, C.E.M., et Biegstraaten, M. (2017) Phenotype, Disease Severity and Pain are Major Determinants of quality of life in Fabry Disease: Results from a Large Multicenter Cohort Study. *J. Inherit. Metab. Dis.* 41(1): 141-149.
- Aronovich, E.L., et Hackett, P.B. (2016) Lysosomal Storage Disease: Gene Therapy on Both Sides of the Blood-Brain Barrier. *Mol. Genet. Metab.* 114(2): 83-93.

- Auray-Blais, C., Boutin, M., Gagnon, R., Dupont, F.O., Lavoie, P., Clarke, J.T. (2012a) Urinary Globotriaosylsphingosine-related Biomarkers for Fabry Disease Targeted by Metabolomics. *Anal. Chem.* 84(6): 2745-2753.
- Auray-Blais, C., Lavoie, P., Zhang, H., Gagnon, R., Clarke, J.T., Maranda, B., Young, S.P., An, Y., Millington, D.S. (2012b) An Improved Method for Glycosaminoglycan Analysis by LC-MS/MS of Urine Samples Collected on Filter Paper. *Clin. Chim. Acta* 413(7-8): 771-778.
- Auray-Blais, C., et Boutin, M. (2012c) Novel Gb(3) Isoforms Detected in Urine of Fabry Disease Patients: a Metabolomic study. *Curr. Med. Chem.* 19(19): 3241-3252.
- Auray-Blais, C., Blais, C.M., Ramaswami, U., Boutin, M., Germain, D.P., Dyack S., Bodamer, O., Pintos-Morell, G., Clarke, J.T., Bichet, D.G., Warnock, D.G., Echevarria, L., West, M.L., et Lavoie, P. (2015), Urinary Biomarker Investigation in children with Fabry Disease using Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 438: 195-204.
- Auray-Blais, C., Lavoie, P., Boutin, M., Ntwari, A., Hsu, T.R., Huang, C.K., et Niu, D.M. (2017) Biomarkers associated with clinical manifestations in Fabry Disease Patients with a late-onset Cardiac Variant Mutation. *Clin. Chim. Acta* 466: 185-193.
- Banerjee, S., et Mazumber, S. (2012) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012: 282574.
- Beasley-Green, A., (2016) Urine Proteomics in Era of Mass Spectrometry. *Int. Neurol. J.* 20(Suppl 2): S70-75.
- Belinda, J., Mehta, S., Qipo, A., Kim, K., Cohen, H.W., Moore, R.M., He, J.C., et Sharma, S. (2014) A Comparison of Podocyturia, Albuminuria and Nephropathy in Predicting the Development of Preeclampsia: A prospective Study. *PLoS One* 9(7): e1011445.
- Bendtsen, T.F., et Nyengaard, J.R. (1992), Glomerular Number and Size in Relation to Age, Kidney Weight and Body Surface in Normal Man. *Anat. Rec.* 232(2): 194-201.
- Benjamin, E.R., Khanna, R., Schilling, A., Flanagan, J.J., Pellegrino, L.J., Brigol, N., Lun, Y., Guillen, D., Ranes, B.E., Frascella, M., Soska, R., Feng, J., Dundan, L., Young, B., Lockhart, D.J., et Valenzano, K.J. (2012) Co-administration With the Pharmacological Chaperone AT1001 Increases Recombinant Human α -Galactosidase A Tissue Uptake and Improves Substrate Reduction in Fabry Mice. *Mol. Ther.* 20(4): 717-726.
- Benjamin, E.R., Valle, M.C.D., Wu, X., Katz, E., Pruthi, F., Bond, S., Bronfin, B., Williams, H., Yu, J., Bichet, D.G., Germain, D.P., Giugliani, R., Hughes, D., Schiffmann, R., Wilcox, W.R., Desnick, R.J., Kirk, J., Barth, J., Barlow, C., Valenzano, K.J., Castelli, J., et Lockhart, D.J. (2017) The Validation of Pharmacogenetics for the Identification of Fabry Patients to be treated with Migalastat. *Genet. Med.* 19(4): 430-438.

Berg, T., et Strand, D.H. (2011) ^{13}C labelled internal standards – A Solution to Minimize Ion Suppression Effects in Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Analyses of Drugs in Biological Samples? *J. Chromato. A* 1218(52): 9366-9374.

Biarc, J., Simon, R., Fonbonne, C., Léonard, J.F., Gauthier, J.C., Pasquier, O., Lemoine, J. et Salvador, A. (2015) Absolute Quantification of Podocalyxin, a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Human Urine, by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1397: 81–85,

Biffi, A. (2016) Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders: a good start. *Hum. Mol. Genet.* 25(1): 65-75.

Boesl, U. (2017) Time-of-Flight Mass Spectrometry: Introduction to the Basics, *Mass Spectrometry Reviews* 36 (1): 86-109.

Bohle, A., Aeikens, B., Eenboom, A., Fronholt, L., Plate, W.R., Xiao, J.C., Greschniok, A., et Wehrmann, M. (1998) Human Glomerular Structure under Normal Conditions and in Isolated Glomerular Disease. *Kidney Int.* 54(67), S186-S188.

Bouchireb, K., Boyer, O., Gribouval, O., Nevo, F., Huynh-Cong, E., Morinière, V., Campait, R., Ars, E., Brackman, D., Dantal, J., Eckart, P., Gigante, M., Lipska, B.S., Liutkus, A., Megarbane, A., Mohsin, N., Ozaltin, F., Saleem, M.A., Schaefer, F., Soulam, K., Torra, R., Garcelon, N., Mollet, G., Dahan, K. et Antignac, C. (2014) NPHS2 Mutations in Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: a Mutation Update and the Associated Phenotypic Spectrum. *Hum. Mutat.* 35(2): 178–186.

Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P. et Antignac, C. (2000) NPHS2, Encoding the Glomerular Protein Podocin, is Mutated in Autosomal Recessive Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Nature Genet.* 24(4): 349-354.

Boutin, M., Gagnon, R., Lavoie, P., et Auray-Blais, C. (2012) LC-MS/MS analysis of plasma Lyso-Gb₃ in Fabry Disease. *Clin. Chim. Acta* 414: 273-280.

Boutin, M., Sun, Y., Shacka, J.J., et Auray-Blais C. (2016) Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Glucosylceramide and Galactosylceramide Isoforms in Brain Tissues at Different Stages of Parkinson Disease. *Anal. Chem.* 88(3): 1856-1863.

Boutin, M., Menkovic, I., Martineau, T., Vaillancourt-Lavigne, V., Toupin, A., et Auray-Blais, C. (2017) Separation and Analysis of Lactosylceramide, Galabiosylceramide, and Globotriaosylceramide by LC-MS/MS in urine of Fabry Disease Patients. *Anal. Chem.* 89(24): 13382-13390.

Brown, M.A. (2012) Pre-eclampsia: Proteinuria in Pre-eclampsia –does it matter any more? *Nat. Rev. Nephrol.* 8(10): 563–565.

Büyükköroğlu, G., Dora, D.D., Özdemir, F., et Hızıl, C. (2018) Chapter 15 – Techniques for Protein analysis. De V. Azevedo & D. Barh (Éds.) *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Brésil: Academic Press (1^e) 317-351.

Cabrera, G., Politei, J., Antongiovani, N., and Amartino, H. (2017) Effectiveness of Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease: Long term experience in Argentina. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 11: 65-68.

Canadian Fabry Disease Initiative (CFDI) Guideline 2018, The Garrod Association. <http://www.garrod.ca>, 2018 (page consultée le 04 décembre 2018).

Chalmers, M.J., Mackay, C.L., Hendrickson, C.L., Wittke, S., Walden, M., Mischak, H., Filser, D., Just, I. et Marshall, A.G.(2005) Combined Top-Down and Bottom-Up Mass Spectrometric Approach to Characterization of Biomarkers for Renal Disease. *Anal. Chem.*, 77(22): 7163-7171.

Colpart, P., et Félix, S. (2017) Fabry Nephropathy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 141(8): 1127-1131.

Cook, J.D., Strauss, K.A., Caplan, Y.H., Lodico, C.P., et Bush D.M. (2007) Urine pH: The Effects of Time and Temperature after Collection. *J. Anal. Toxicol.* 31(8): 486-496.

Coutinho, M.F., Santos, J.I., et Alves, S. (2016) Less is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17(7): 1065.

Craici, I.M., Wagner, S.J., Bailey, K.R., Fitz-Gibbon, P.D., Wood-Wentz, C.M., Turner, S.T., Hayman, S.R., White, W.M., Brost, B.C., Rose, C.H., Grande, J.P. et Garovic V.D. (2013) Podocyturia Predates Proteinuria and Clinical Features of Preeclampsia: A Longitudinal Prospective Study. *Hypertension* 61(6): 1289-1296.

Cravatt, B.F., Simon, G.M., et Yates, J.R. (2007) The Biological Impact of Mass-Spectrometry-Based Proteomics. *Nature*. 450(7172): 991-1000.

Davidson, S.M., et Vander Heiden, M.G. (2017) Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57: 481-507.

Decramer, S., Gonzalez de Peredo, A., Breuil, B., Mischak, B., Bascands, J.L., et Schanstra, J.P. (2008) Urine in Clinical Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*. 7(10): 1850-1862.

Del Pino, M., Andrés, A., Bernabéu, A.Á., de Juan-Rivera, J., Fernández, E., de Dios García Díaz, J., Hernández, D., Luño, J., Fernández, I.M., Paniagua, J., Posada de la Paz, M., Rodríguez-Pérez, J.C., Santamaría, R., Torra, R., Ambros, J.T., Vidau, P., et Torregrosa, J.V. (2018) Fabry Nephropathy: An Evidence-Based Narrative Review. *Kidney Blood Press. Res.* 43(2): 406-421.

Del Pozo-Rodriguez, A., Solinis, M., et Rodriguez-Gascon, A. (2016) Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 109: 184-193.

Dill, K.A., Ozkan, S.B., Shell, M.S., et Weikl, T.R. (2008) The Protein Folding Problem. *Annu. Rev. Biophys.* 37: 289-316.

Drucker, E., et Krapfenbauer, K. (2013) Pitfalls and Limitations in Translation from Biomarker Discovery to Clinical Utility in Predictive and Personalised Medicine. *EPMA. J.* 4(1): 7.

Dupont, F.O., Gagnon, R., Boutin, M., et Auray-Blais, C. (2013) A Metabolomic study reveals novel plasma Lyso-Gb₃ analogs as Fabry Disease biomarkers. *Curr. Med. Chem.* 20(2): 280-288.

Eaton, D.C. et Pooler J.P. (2018) Renal Functions, Basic processes, and Anatomy. Dans D.C. Eaton & J.P. Pooler (Éds). *Vander's Renal Physiology*. New York : McGraw-Hill (9^e éd.), 1-22.

Echevarria, L., Benistan, K., Toussaint, A., Dubourf, O., Hagege, A.A., Eladari, D., Jabbour, F., Beldjorf, C., De Mazancourt, P., et Germain, D.P. (2016) X-chromosome Inactivation in Female Patients with Fabry Disease. *Clin. Genet.* 89(1): 44-54.

El-Aneed, A., Cohen, A., et Banoub., J. (2009) Mass spectrometry, Review of the Basic: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectrometry Reviews* 44(3): 210-230.

English, F.A., Kenny, L.C., et McCarthy, F.P. (2015) Risk Factors and Effective Management of Preeclampsia. *Integr. Blood Press. Control* 8: 7-12.

Fall, B., Scott, C.R., Mauer, M., Shankland, S., Pippin, J., Jefferson, J.A., Wallace, E., Warnock, D., et Najafian, B. (2016) Urinary Podocyte Loss Is Increased in Patients with Fabry Disease and Correlated with Clinical Severity of Fabry Nephropathy. *PLoS One* 11(12): e0168346.

Feist, P., et Hummon, A.B. (2015) Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques fro Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Sample. *Int. J. Mol. Sci.* 16(2): 3537-3563.

Ferreira, S., Auray-Blais, C., Boutin, M., Lavoie, P., Nunes, J.P., Martins, E., Garman S., et Oliveira, J.P. (2015) Variations in the GLA gene Corretate with Globotriaosylceramide and Globotriaosylsphingosine analog levels in urine and plasma. *Clin. Chim, Acta* 447: 96-104.

Filip, S., Vougas, K., Zoidakis, J., Latosinska, A., Mullen, W., Spasovski, G., Mischak, H., Vlahou, A., et Jankowski, J. (2015) Comparison of Depletion Strategies for the Enrichment of Low-Abundance Proteins in Urine. *PLoS One.* 10(7): e0133773.

Fisher, S.J. (2016) Why is Placentation Abnormal in Preeclampsia? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213(4 Suppl): S115-122.

Fletcher, H., et Hickey, I. (2013) DNA Mutation. De H. Fletcher et I. Hickey (Éds.) *Genetics*. London: Garland Science (4^e éd.), 20-24.

Fu, Q., Grote, E., Zhu, J., Jelinek, C., Köttgen, A., Coresh, J., et Van Eyk, J.E. (2015) An Empirical Approach to Signature Peptide Choice for Selected Reaction Monitoring: Quantification of Uromodulin in Urine. *Clin. Chem.* 62: 198-207.

Fukasawa, H., Bornheimer, S., Kudlicka, K. et Farquhar, M.G. (2009) Slit Diaphragms Contain Tight Junction Proteins, *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(7): 1491-1503.

Fukuda, A., Wickman L.T., Venkatareddy, M.P., Wang, S.Q., Chowdhury, M.A., Wiggins, J.E., Shedden K.A., et Wiggins R.C. (2012) Urine podocin:nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker. *Nephrol. Dial. Transplant.* 27(11): 4079-4087.

Garovic, V.D., Craici, I.M., Wagner, S.J., White, W.M., Brost, B.C., Rose, C.H., Grande, J.P., et Barnidge, D.R. (2013) Mass Spectrometry as a Novel Method for Detection of Podocyturia in Pre-eclampsia. *Nephrol. Dial. Transplant* 28(6): 1555-1561.

Garovic, V.D., Wagner, S.J., Turner, S.T., Rosenthal, D.W., Watson, W.J., Brost, B.C., Rose, C.H., Gavrilova, L., Craigo, P., Bailey, K.R., Achenbach, J., Schiffer, M., et Grande, J.P. (2007) Urinary Podocyte Excretion as a Marker for Preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196(4): 320e1-7.

Germain, D.P., Benistan, K., et Echevarria, L. (2013) Pharmacological Chaperons: a Novel Therapeutic Approach for Genetic Diseases. *Med. Sci. (Paris)*. 29(6-7): 579-582.

Germain, D.P., Hughes, D.A., Nicholls, K., Bichet, D.G., Giugliani, R., Wilcox, W.R., Feliciani, C., Shankar, S.P., Ezgu, F., Amartino, H., Bratkovic, D., et Feldt-Rasmussen, U. (2016) Treatment of Fabry's Disease with the Pharmacologic Chaperone Migalastat. *N. Engl. J. Med.* 375: 545-555.

Griffiths, J. (2008) A Brief History of Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 80(15): 5678-5683.

Guaragna, M.S., Lutaif, A.C.G.B., Piveta, C.S.C., Souza, M.L., De Souza, S.R., Henriques, T.B., Maciel-Guerra, A.T., Belangero, V.M.S., Guerra-Junior, G., et De Mello, M.P. (2015) NPHS2 Mutations Account for Only 15% of Nephrotic Syndrome Cases. *BMC Medical Genetics* 16:88.

Guérard, N., Oder, D., Nordbeck, P., Zwingelstein, C., Morand, O., Welford, R.W.D., Dingemanse, J. et Wanner, C. (2018) Lucerastat, an Iminosugar for Substrate Reduction Therapy: Tolerability Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics in Patients With Fabry Disease on Enzyme Replacement. *Clin. Pharmacol. Ther.* 103(4): 703-711.

Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., et Ozkan, S.A. (2013) UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia* 76(21-22): 1365-1427.

- Gundry, R.L., White, M.Y., Murray, C.I., Kane, L.A., Fu, Q., Stanley, B.A., et Van Eykm J.E. (2010) Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-up Proteomics Workflow. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 90(1): 10.25.1-10.25.23.
- Hasholt, L., Ballegaard, M., Bundgaard, H., Christiansen, M., Law, I., Lund, A.M., Norremolle, A., Krogh Rasmussen, A., Ravn, K., Tumer, Z., Wibrand, F. et Feldt-Rasmussen, U. (2017) The D313Y Variant in the GLA Gene – no evidence of pathogenic role in Fabry Disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 77(8): 617-621.
- Hara, M., Yamamoto, T., Yanagihara, T., Takada, T., Itoh, M., Adachi, Y., Yoshizumi, A., Kawasaki, K., et Kihara, I. (1995) Urinary Excretion of Podocalyxin Indicates Glomerular Epithelial Cell Injuries in Glomerulonephritis. *Nephron.* 69(4): 397-403.
- Haram, K., Mortensen, J.H., et Nagy, B. (2014) Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome, *J. Pregnancy* 2014: 910751.
- Heby, M., Elebro, J., Nodin, B., Jirström, K., et Eberhard, J. (2015) Prognostic and Predictive Significance of Podocalyxin-like Protein Expression in Pancreatic and Periapillary Adenocarcinoma. *BMC Clin. Pathol.* 15: 10.
- Herrera-Garcia, G., et Contag, S. (2014) Maternal Preeclampsia and Risk for Cardiovascular Disease in Offspring. *Curr. Hypertens. Rep.* 16(9): 475.
- Human Gene Mutation Database (HGMD) (2017). Human Gene Mutation Database. Dans <http://www.hgmd.org/> (page consultée le 18 avril 2018).
- Hill, N.R., Fatoba, S.T., Oke, J.L., Hirst, J.A., O’Callaghan, C.A., et Lasserson, D.S. (2016) Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 11(7): e0158965.
- Honeycutt, A.A., Segel, J.E., Zhuo, X., Hoerger, T.J., Imai, K., et Williams D. (2013), Medical Costs of CKD in the Medicare Population. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24(9): 1478-1483.
- Hoffman E. et Stoobant V. (2007) Introduction and ion sources. De E. de Hoffmann & V. Stroobant (Éds.) *Mass spectrometry: Principles and Applications*. New Jersey: Wiley (3^e éd.), 1-25.
- Holstein, C.A., Gafken, P.R., et Martin, D.B. (2011) Collision Energy Optimization of b- and y-Ions for Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* 10(1): 231-240.
- Hsu, T.R., et Niu, D.M. (2018) Fabry Disease: Review and Experience during Newborn Screening. *Trends. Cardiovasc. Med.* 28(4): 274-281.
- Humbert L. (2010), Solid Phase Extraction (SPE): Theory and Applications. *Ann. Toxicol. Anal.* 22(2): 61-68 (en français).

- Hussein, W., et Lafayette, R.A (2014) Renal Function in Normal and Disordered Pregnancy, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 23(1): 46-53.
- Hustoft, H.K., Malerod, H., Wilson, S.R., Reubsæet, L., Lundanes, E., et Greibrokk, T. (2012) A Critical Review of Trypsin Digestion for LC-MS Based Proteomics. *Intech.* 74-92.
- Jardim, L.L., Rios, D.R., Perucci, L.O., de Sousa, L.P., Gomes, K.B., et Dusse, L.M. (2015) Is the Imbalance between Pro-angiogenic and Anti-angiogenic Factors associated with Preeclampsia? *Clin. Chim. Acta* 447: 34-38.
- Juchniewicz, P., Kloska, A., Tylki-Szymańska, A., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Węgrzyn, G., Moskot, M., Gabig-Cimińska, M., et Piotrowska, E. *et al.* (2018) Female Fabry Disease patients and X-chromosome inactivation. *Gene* 641: 259-264.
- Kadian, N., Raju, Rashid, M., Malik, M.Y., Taneja, I., et Wahajuddin, M. (2016) Comparative Assessment of Bioanalytical Method Validation Guidelines for Pharmaceutical Industry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 126: 83-97.
- Kaprio, T., Fermér, C., Hagström, J., Mustonen, H., Böckelman, C., Nilsson, O., et Haglund, C. (2014) Podocalyxin is a Marker of Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *BMC Cancer* 14:493.
- Kasserra, H.P. et Laidler, K.J. (1969) pH Effets in Trypsin Calalysis. *Can. J. Chem.* 47: 4021.
- Kebarle P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spec.* 35(7): 804-817.
- Kelder, T.P., Penning, M.E., Uh, H.W., Cohen, D., Bloemenkamp, K.W., Bruijn, J.A., Scherjon, S.A. et Baelde, H.J. (2012) Quantitative Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Podocyturia is a Feasible Diagnostic Tool in Preeclampsia. *Hypertension* 60(6): 1538-1544.
- Kell, D.B., et Kenny, L.C. (2016) A Dormant Microbial Component in the Development of Preeclampsia. *Front Med. (Lausanne)* 3: 60.
- Kerjaschki, D., Sharkey, D.J., et Farquhar, M.G. (1984) Identification and Characterization of Podocalyxin: The Major Sialoprotein of the Renal Glomerular Epithelial Cell. *J. Cell. Biol.* 98(4): 1591-1596.
- Kerjaschki, D. (1994) Dysfunctions of Cell Biological Mechanisms of Visceral Epithelial Cell (podocytes) in Glomerular Diseases. *Kidney Int.* 45(2): 300–313.
- Kershaw, D.B, Wiggins, J.E., Wharram, B.L., et Wiggins, R.C. (1997) Assignment of the Human Podocalyxin-like Protein (PODXL) gene to 7q32-q33. *Genomics* 45(1): 239-240.
- Khandke, K.M., Fairwell, T., Chait, B.T., et Manjula, B.N. (1989) Influence of ions on cyclization of the amino terminal glutamine residues of tryptic peptides of streptococcal

PepM49 protein. Resolution of cyclized peptides by HPLC and Characterization by Mass Spectrometry. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 34(2): 118-123.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (2012) Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 3(1): 1-150.

Kikuchi, M., Wickman, L., Hodgins, J.B. et Wiggins R.C. (2015) Podometrics as a Potential Clinical Tool for Glomerular Disease Management. *Semin. Nephrol.* 35(3): 245-255.

Kitiyakara, C., Yamwong, S., Vathesatogkit, P., Chittamma, A., Cheepudomwit, S., Vanavanan, S., Hengprasith, B., et Sritara, P. (2012) The Impact of Different GFR Estimating Equations on the Prevalence of CKD and Risk Groups in a Southeast Asian Cohort using the new KDIGO guidelines. *BMC Nephrology* 13:1.

Kriz, W., Shirato, I, Nagata, M., LeHir, M., et Lemley, K.V. (2013) The Podocyte's Response to Stress: the Enigma of Foot Process Effacement. *Am. J. Renal. Physiol.* 304(4): F333-F347.

Kriz, W., et Lemley, K.V. (2015) A Potential Role for Mechanical Forces in the Detachment of Podocytes and the Progression of CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26(2): 258-269.

Krutzén, E., Olofsson, P., Bäck, S.E., et Nilsson-Ehle, P. (1992) Glomerular Filtration Rate in Pregnancy: a Study in Normal Subjects and in Patients with Hypertension, Preeclampsia and Diabetes. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 52: 387–392.

Kushnir, M.M., Mrozinski, P., Rockwood, A.L., et Crockett D.K. (2009) A Depletion Strategy for Improved Detection of Human Proteins from Urine. *J. Biomol. Tech.* 20(2): 101-108.

Lamb, E.J., MaKenzie, F., Stevens, P.E. (2009) How should proteinuria be detected and measured? *Ann. Clin. Biochem.* 46(Pt3): 205-217.

Lambert, G., Brichant, J.F., Hartstein, G., Bonhomme, V., et Dewandre, P.Y. (2014) Preeclampsia: an update. *Acta Anaesthesiol. Belg.* 65(4): 137-149.

Lehtonen, S., Lehtonen, E., Kudlicka, K., Holthöfer, H. et Farquhar, M.G. (2004) Nephrin Forms a Complex with Adherens Junction Proteins and CASK in Podocytes and in Madin–Darby Canine Kidney Cells Expressing Nephrin. *Am. J. Pathol.* 165(3): 923–936.

Leslie, K., Thilaganathan, B., et Papageorgiou, A. (2011) Early Prediction and Prevention of Preeclampsia. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25(3): 343-354.

León, I.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N., et Sprenger, R.R. (2013) Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis. *Mol. Cell Proteomics* 12(10): 2992-3005.

Levine, R.J., Maynard, S.E., Qian, C., Lim, K.H., England, L.J., Yu, K.F., Schisterman, E.F., Thadhani, R., Sachs, B.P., Epstein, F.H., Sibai, B.M., Sukhatme, V.P., et Karumanchi, S.A.

(2004) Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350: 672-683.

Li, J., Li, Y., Brophy, P.D., et Kershaw, D.B. (2001) Gene Structure and Alternative Splicing of Murine Podocalyxin: a member of the CD34 Sialomucin Family. *DNA Seq.* 12(5-6): 407-412.

Liebler, D.C., et Zimmerman, L.J. (2013) Target Quantitation of Proteins by Mass Spectrometry. *Biochemistry.* 52(22): 3797-3806.

Lin, Y., Zhou, J., Bi, D., Chen, P., Wang, X., et Liang, S. (2008) Sodium-deoxycholate-assisted Tryptic Digestion and Identification of Proteolytically Resistant Proteins. *Anal. Biochem.* 377(2): 259-266.

Lovgren, T.R., Dugoff, L., et Galan, H.L. (2010) Uterine Artery Doppler and Prediction of Preeclampsia. *Clin Obstet. Gynecol.* 53(4): 888-898.

Maden, K.M., et Tisher, C.C. (1986) Structural-Functional Relationships along the Distal Nephron. *Am. J. Physiol.* 250(1Pt2): F1-15.

Maden, K.M. et Tisher, C.C. (2004). Anatomy of Kidney. Dans Brenner B.M. (Éds). *The kidney*. Philadelphie : Saunders (7^e éd., vol. 1), 2-20.

Macario, A.J., et Conway de Macario, E. (2007) Molecular Chaperones: Multiple Functions, Pathologies, and Potential Applications. *Front. Biosci.* 12: 2588-2600.

Markham, A. (2016) Migalastat: First Global Approval. *Drugs.* 76(11): 1147-1152.

Mathew, S., Chen, X., Pozzi, A. et Zent, R. (2012) Integrins in Renal Development. *Pediatr. Nephrol.* 27(6): 891-900.

Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., et Chavez-Eng, C.M. (2003) Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75(13): 3019-3030.

Mauer, M., Sokolovskiy, A., Barth, J.A., Castelli, J.P., Williams, H.N., Benjamin E.R. et Najafian, B. (2017) Reduction of Podocyte Globotriaosylceramide Content in Adult Male Patients with Fabry Disease with Amenable GLA Mutations Following 6 months of Migalastat Treatment. *J. Med. Genet.* 54(11): 781-786.

Maynard, S.E., Min, J.Y., Merchan, J., Lim, K.H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., Epstein, F.H., Sukhatme, V.P., et Karumanchi, S.A. (2003) Excess Placental Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt1) may contribute to Endothelial Dysfunction, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 111(5): 649-658.

Medzihradszky, K.F. (2005) Peptide Sequence Analysis. *Methods Enzymol.* 402: 209-244.

- Mehta A. et Widmer U. (2006) Delay in diagnostic. De A. Mehta, M. Beck & G. Sunder-Plassman (Éds.). *Fabry Disease : Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford, UK: Oxford PharmaGenesis (1^e ed.)
- Miner, J.H. (2012) The Glomerular Basement Membrane. *Exp. Cell. Res.* 318 (9): 973-978.
- Moein, M.M., Beqqali, A.E., et Abdel-Rehim, M. (2017) Bioanalytical Method Development and Validation: Critical Concepts and Strategies. *J. Chromato. B* 1043: 3-11.
- Mol, B.W.J., Roberts, C.T., Thangaratinam, S., Magee, L.A., de Groot, C.J.M., et Hofmeyr, G.J. (2016), Pre-eclampsia. *Lancet* 387(10022): 999-1011.
- Morton, A. (2016) Imitators of Preeclampsia: a Review. *Pregnancy Hypertens.* 6(1): 1-9.
- Müller-Deile, J., et Schiffer, M. (2017) Podocytes from the Diagnostic and Therapeutic Point of View. *Pflugers Arch.* 469(7-8): 1007-1015.
- Najafian, B., Svarstad, E., Bostad, L., Gubler, M.C., Tøndel, C., Whitley, C., et Mauer, M. (2011) Progressive Podocyte Injury and Globotriaosylceramide Accumulation in Young Patients with Fabry Disease. *Kidney Int.* 79(6): 663-70.
- Nakamura, T., Ushiyama, C., Suzuki, S., Hara, M., Shimada, N., Ebihara, I., Koide, H. (2000) Urinary Excretion of Podocytes in Patients with Diabetic Nephropathy. *Nephrol. Dial Transplant* 15(9): 1379–1383.
- National Clinical Guideline Centre (NICE) (2014) Chronic kidney disease (partial update): Early Identification and Management of Chronic Kidney Disease in Adults in Primary and Secondary Car. *National Clinical Guideline Centre (UK)*, 182.
- Nielsen, J.S., et McNagny, K.M. (2009) The Role of Podocalyxin in Health and Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(8):1669-1679.
- O’Callaghan C.A. (2017) The Kidney: Structural Overview. Dans West Sussex (Éds). *The renal system at a glance*. Malden : Wiley Blackwell (4^e éd.), 2-4.
- Olsen, J.V., Ong, S.E., et Mann, M. (2004) Trypsin Cleaves Exclusively C-Terminal to Arginine and Lysine Residues. *Mol. Cell Proteomics* 3(6): 608-614.
- Ortiz, A., Germain, D.P., Desnick, R.J., Politei, J., Mauer, M., Burlina, A., Eng, C., Hopkin, R.J., Laney, D., Linhart, A., Waldek, S., Wallace, E., Weidemann, F., Wilcox, W.R. (2018) Fabry Disease Revisited: Management and Treatment Recommendations for Adult Patients. *Mol. Genet. Metab.* 123(4): 416-427.
- Pacher, J., Brix, E., et Lehner, R. (2014) The Mode of Delivery in Patients with Preeclampsia at term Subject to Elective or Emergency Cesarean Section. *Arch. Gynecol. Obstet.* 289(2): 263-267.

Pagtalunan, M.E., Miller, P.L., Jumping-Eagle, S., Nelson, R.G., Myers, B.D., Rennke, H.G., Coplon, N.S., Sun, L., et Meyer T.W. (1997) Podocyte Loss and Progressive Glomerular Injury in Type II Diabetes. *J. Clin. Invest.* 99(2): 342–348.

Panuwet, P., Hunter, R.E., D'Souza, P.E., Chen, X., Radford, S.A., Cohen, J.R., Marder, M.E., Kartavenka, K., Ryan, P.B., et Barr, D.B. (2016) Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitorage. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46(20): 93-105.

Perratta, F., Antongiovanni, N., et Jaurretch, S. (2017) Early Renal Involvement in a Girl with Classic Fabry Disease. *Case Rep. Nephrol.* 2017:9543079

Petrovic, M., Gros, M., et Barcelo, D. (2006) Multi-Residue Analysis of Pharmaceuticals in Wastewater by Ultra-performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromato. A* 1124(1-2), 68-81.

Pierchala, B.A., Muñoz, M.R., et Tsui, C.C. (2010) Proteomic Analysis of the Slit Diaphragm Complex: CLIC5 is a Protein Critical for Podocyte Morphology and Function. *Kidney Int.* 78(9): 868–882.

Pisani, A., Visciano, B., Roux, G.D., Sabbatini, M., Porto, C., Parenti, G., et Imbriaco, M. (2012) Enzyme Replacement Therapy in Patients with Fabry Disease : State of the art and review of the literature. *Metabolism.* 107(3): 267-275.

Plasencia, W., Maiz, N., Poon, L., Yu, C., et Nicolaidis, K.H.. (2008) Uterine artery Doppler at 11+ 0 to 13+ 6 and 21+ 0 to 24+6 weeks in the prediction of preeclampsia. *Ultrasound Obstet. Gyencol.* 32(2): 138–146.

Platt, F.M., et Walkley, S.U. (2004) Lysosomal defects and storage. Dans F.M. Platt & S.U. Walkley (Éds). *Lysosomal disorders of the brain*. Oxford, UK: *Oxford University press* (1^{er}éd.),

Proc, J.L., Kuzyk, M.A., Hardie, D.B., Yang, J., Smith, D.S., Jackson, A.M., Parker C.E., et Borchers, C.H. (2010) A quantitative Study of the Effects of Chaotropic Agents, Surfactants, and Solvents on the Digestion Efficiency of Human Plasma Proteins by Trypsin. *J. Proteome Res.* 9(10): 5422-5437.

Provençal, P., Boutin M., Dworski, S., Au, B., Medin, J.A., et Auray-Blais, C. (2016) Relative Distribution of Gb₃ isoforms/analogues in NOD/SCID/Fabry mice Tissues determined by Tandem Mass Spectrometry. *Bioanalysis* 8(17): 1793-1807.

Reiser, J., et Altintas, M.M., (2016) Podocytes, *F1000 Faculty Rev.* 144: 1-19.

Rombouts, I., Lagrain, B., Brunnbauer, M., Delcour, J.A., et Koehler, P. (2013) Improved Identification of Wheat Gluten proteins through Alkylation of Cysteine Residues and Peptide-based Mass Spectrometry. *Sci. Rep.* 3: 2279.

Rops, A.L., Loeven, M.A., Van Gemst, J.J., Eversen, I., Van Wijk, X.M., Dijkman H.B., Van Kuppevelt, T.H., Berden, J.H., Rabelink, T.J., Esko, J.D. et Van der Vlag, J. (2014) Modulation of Heparin Sulfate in the Glomerular Endothelial Glycocalyx Decreases Leukocyte influx during Experimental Glomerulonephritis. *Kidney Int.* 86(5): 932-942.

Roselli, S., Heidet, L., Sich, M., Henger, A., Kretzler, M., Gubler, M.C., et Antignac, C. (2004) Early Glomerular Filtration Defect and Severe Renal Disease in Podocin-Deficient Mice. *Mol. Cell. Biol.* 24(2): 550–560.

Rostgaard, J., et Qvortrup, K. (2002) Sieve Plugs in Fenestrae of Glomerular Capillaries–Site of the Filtration Barrier? *Cells Tissues Organs* 170(2-3): 132–138.

Santé Canada (2019) <https://hpr-rps.hres.ca/reg-content/sommaire-motif-decision-detailTwo.php?lang=fr&linkID=SBD00372>. (Consult  le 18 avril 2019).

Say, L., Chou, D., Gemmill, A., Tun alp,  ., Moller, A.B., Daniels, J., G lmezoglu, A.M., Temmerman, M., et Alkema, L. (2014) Global Causes of Maternal Death: a WHO Systematic Analysis. *Lancet Glob. Health.* 2(6): e323-333.

Schermer, B., et Benzing, T. (2009) Lipid-Protein Interactions along the Slit Diaphragm of Podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(3): 473–478.

Schiffmann, R., Askari, H., Timmons, M., Robinson, C., Benko, W., Brady, R.O., et Ries, M. (2007) Weekly Enzyme Replacement Therapy may Slow Decline of Renal Function in Patients with Fabry Disease who are on Long-Term Biweekly Dosing. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18(5): 1576–1583.

Schiffman, R., Hughes, D.A., Linthorst, G.E., Ortiz, A., Svarstad, E., Warnock, D.G., West, M.L., et Wanner, C. (2016) Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry Disease: Conclusions form a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 91(2): 284-293.

Scott, K.B., Turko, I.V., et Phinney, K.W. (2015) Quantitative Performance of Internal Standard Platforms for Absolute Protein Quantification Using Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 87(8): 4429-4435.

Sekuclic, M., et Sekulic, S.P. (2013) A Compendium of Urinary Biomarkers Indicative of Glomerular Podocytopathy. *Patholog. Res. Int.* 2013:782395.

Sicar, M., Thadhani, R., et Karumanchi, S.A. (2015) Pathogenesis of Preeclampsia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 24(2): 131-138.

Simon, R., Lemoine, J., Fonbonne, C., Jaffuel, A., Léonard, J.F., Gauthier, J.C., Pasquier, O., et Salvador, A. (2014) Absolute Quantification of Podocin, a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Human Urine, by Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring Cubed Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 94: 84–91.

- Shankland, S.J., Smeets, B., Pippin, J.W., et Moeller, M.J. (2014) The Emergence of the Glomerular Parietal Epithelial Cell. *Nat. Rev. Nephrol.* 10(3): 158–173.
- Shuford, C.M., Walters, J.J., Holland, P.M., Screenivasan, U., Askari, N., Ray, K., et Grant, R.P. (2017) Absolute Protein Quantification by Mass Spectrometry: Not as Simple as Advertised. *Anal. Chem.* 89(14): 7406-7415.
- Skoberne, A., Konieczny, A., et Schiffer, M. (2009) Glomerular Epithelial Cells in the Urine: What has to be done to make them worthwhile? *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 296(2): F230-241.
- Soares, M.J., Chakraborty, D., Kubota, K., Renaud, S.J., et Rumi, M.A. (2014) Adaptive Mechanisms Controlling Uterine Spiral Artery Remodeling during the Establishment of Pregnancy. *Int. J. Dev. Biol.* 58(2-4): 247-259.
- Soleimani, M., Merherb, M., et Matar, R. (2015) Human Gene Therapy – The Future of Health Care. *Ham. Med. J.* 8(1): 101-110.
- Spada, M., Pagliardini, S., Yasuda, M., Tukel, T., Thiagarajan, G., Sakuraba, H., Ponzone, A., et Desnick, R.J. (2006) High Incidence of Later-Onset Fabry Disease Revealed by Newborn Screening. *Am. J. Hum. Genet.* 79(1): 31-40.
- Spencer, K., Cowans, N.J., Chefetz, I., Tal, J., Kuhnreich, I., et Meiri, H. (2007) Second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index and maternal serum PP13 as markers of pre-eclampsia. *Prenat. Diagn.* 27(3): 258-63.
- Stocks, G. (2014) Preeclampsia: Pathophysiology, Old and New Strategies for Management. *Eur. J. Anaesthesiol.* 31(4): 183-189.
- Takeda, T., McQuistan, T., Orlando, R.A., et Farquhar, M.G. (2001) Loss of Glomerular Foot Processes is Associated with Uncoupling of Podocalyxin from Actin Cytoskeleton. *J. Clin. Invest.* 108(2): 289-301.
- Timpl, R. (1989) Structure and Biological Activity of Basement Membrane Proteins. *Eur. J. Biochem.* 180(3): 487–502.
- Tøndel, C., Kanai, T., Larsen, K.K., Ito, S., Politei, J.M., Warnock D.G., et Svarstad (2015) Foot Process Effacement is an Early Marker of Nephropathy in Young Classic Fabry Patients without Albuminuria. *Nephron.* 129(1):16-21.
- Toshimitsu, N. (2008) Biomarker Discovery for Kidney Diseases by Mass Spectrometry, *J. Chromato. B* 870(2): 148-153.
- Toupin, A., Lavoie, P., Arthus, M.F., Abaoui, M., Boutin, M., Fortier, C., Ménard, C., Bichet, D.G., et Auray-Blais, C. (2018) Analysis of Globotriaosylceramide (Gb₃) Isoforms/Analogues in Unfractionated Leukocytes, B Lymphocytes and Monocytes from

Fabry patients using Ultra-High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 1015: 35-49.

Tranquilli, A.L., Dekker, G., Magee, L., Roberts, J., Sibai, B.M., Steyn, W., Zeeman, G.G. et Brown, M.A. (2014) The Classification, Diagnosis and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy: A revised Statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 4(2): 97-104.

Trimarchi, H., Canzonieri, R., Murryan, A., Schiel, A., Araoz, A., Forrester, M., Karl, A., Lombi, F., Andrews, J., Pomeranz, V., Rengel, T., et Zotta, E. (2015a) Copious Podocyturia without Proteinuria and with Normal Renal Function in a Young Adult with Fabry Disease. *Case Rep. Nephrol.* 2015:257628.

Trimarchi, H. (2015b) Podocyturia: What is in a name? *J. Transl. Int. Med.* 3(2): 51–56.

Trimarchi, H., Canzonieri, R., Schiel, A., Politei, J., Stern, A., Andrews, J., Paulero, M., Rengel, T., Araújo, A., Forrester, M., Lombi, F., Pomeranz, V., Iriarte, R., Young, P., Murryan, A. et Zotta, E. (2016) Podocyturia is Significantly Elevated in Untreated vs Treated Fabry Adult Patients. *J. Nephrol.* 29(6): 791-797.

Trimarchi, H. (2017) Podocyturia: Potential Applications and Current Limitations. *World J. Nephrol.* 6(5): 221-228.

Uzan, J., Carbonnel, M., Piconne, O., Asmar, R., et Ayoubi, J.M. (2011) Pre-eclampsia: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Vasc. Health Risk Manag.* 7: 467-474.

Vogelmann, S.U., Nelson, W.J., Myers, B.D., et Lemley K.V. (2003) Urinary Excretion of Viable Podocytes in Health and Renal Disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285(1): F40-48.

Vandermarliere, E., Mueller, M., et Martens, L. (2013) Getting Intimate with Trypsin, The Leading Protease in Proteomics. *Mass Spectrometry Rev.* 32(6): 453-465.

Vitner, E.B., Platt, F.M., et Futerman, A.H. (2010) Common and Uncommon Pathogenic Cascades in Lysosomal Storage Diseases. *J. Biol. Chem.* 285(17): 20423-20427.

Volker, L.A., Schurek, E.M., Rinschen, M.M., Tax, J., Schutte, B.A., Lamkemeyer, T., Ungrue, D., Schermer, B., Benzing, T., et Höhne, M. (2013) Characterization of a Short Isoform of the Kidney Protein Podocin in Human Kidney. *BMC Nephrol.* 14: 102.

Waldek, S., et Feriozzi, S. (2014) Fabry Nephropathy: a Review – How can we optimize the Management of Fabry Nephropathy. *BMC Nephrol.* 15: 72.

Wang, I.K., Muo, C.H., Chang, Y.C., Liang, C.C., Lin, S.Y., Yen, T.H., Chuang, F.R., Chen, P.C., Huang, C.C., Wen, C.P., Sung, F.C., et Morinsky, D.E. (2013) Association between Hypertensive Disorders during Pregnancy and End-stage Renal Disease: a Population-Based Study. *CMAJ.* 185: 207–213.

Waters Corps (2019) www.waters.com (Page consultée le 10 janvier 2018).

Wharram, B.L., Goyal, M., Wiggins, J.E., Sanden, S.K., Hussain, S., Filipiak, W.E., Saunders, T.L., Dysko, R.C., Kohno K., Holzman, L.B. et Wiggins, R.C. (2005) Podocyte Depletion Causes Glomerulosclerosis: Diphtheria Toxin-Induced Podocyte Depletion in rats expressing Human Diphtheria Toxin Receptor Transgene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16(10): 2941–2952.

White, W.M., Garrett, A.T., Craici, I.M., Wagner, S.J., Fitz-Gibbon, P.D., Butters, K.A., Brost, B.C., Rose, C.H., Grande, J.P., et Garovic, V.D. (2014) Persistent urinary podocyte loss following preeclampsia may reflect subclinical renal injury. *PLoS One* 9(3): e92693.

Whiteaker, J.R., Zhao, L., Zhang, H.Y., Feng, L.C., Piening, B.D., Anderson, L., et Paulovich, A. (2007) Antibody-based enrichment of peptides on magnetic beads for mass-spectrometry-based quantification of serum biomarkers. *Anal. Biochem.* 362(1): 44-54.

Widmer, M., Cuesta, C., Khan, K.S., Conde-Agudelo, A., Carroli, G., Fusey, S., Karumanchi, S.A., Lapaire, O., Lumpiganon, P., Sequeire, E., Zavaleta, N., Frusca, T., Gülmezoglu, A.M., et Lindheimer, M.D. (2015) Accuracy of Angiogenic Biomarkers at ≤ 20 Weeks' Gestation in Predicting the Risk of Pre-eclampsia: A WHO multicentre study. *Pregnancy Hypertens.* 5(4): 330-338.

Wiggins J. (2010) Podocytes and Glomerular Function with Aging. *Semin. Nephrol.* 29(6): 587-593.

Xu, T.T., Zhou, F., Deng, C.Y., Huang, G.Q., Li, J.K., et Wang, X.D. (2015) Low-Dose Aspirin for Preventing Preeclampsia and Its Complications: A Meta-Analysis, *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 17(7): 567-573.

Yu, Yanbao, et Pieper, R. (2015) Urinary Pellet Sample Preparation for Shotgun Proteomic Analysis of Microbial Infection and Host Pathogen Interactions. *Methods Mol. Biol.* 1295: 65-74.

Yuan, H., et Yan, N. (2014) The Recombinant Expression Systems for Structure Determination of Eukaryotic Membrane Proteins. *Protein Cell* 5(9): 658-672.

Zhang, H.M., McLoughlin, S.M., Frausto, S.D., Tang, H., Emmett, M.R., et Marshall, A.G. (2010) Simultaneous Reduction and Digestion of Proteins with Disulfide Bonds for Hydrogen/Deuterium exchange Monitored by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 82(4): 1450-1454.

Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.C., et Yates, J.R. (2014) Protein Analysis by Shotgun/Bottom-Up Proteomics. *Chem. Rev.* 113(4): 2343-2394.

Zhou, J.Y., Dann, G.P., Shi, T., Wang, L., Gao, X., Su, D., Nicora, C.D., Shukla, A.K., Moore, R.J., Liu, T., Camp, D.G., Smith, R.D., et Qian, W.J. (2012) A Simple Sodium

Dodecyl Sulfate-assisted Sample Preparation Method for LC-MS-based Proteomics Applications. *Anal. Chem.* 84(6): 2862-2867.

Zhou, W., Yang, S. et Wang, P.G. (2017) Matrix Effects and Application of Matrix Effect Factor. *Bioanalysis*. 9(23): 1839-1844.